

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Tese de doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO NANOESTRUTURADO A SER
UTILIZADO EM ASSOCIAÇÃO COM CÉLULAS-TRONCO PARA A
TERAPIA VASCULAR EM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA.**

Daikelly Iglesias Braghirolli

Orientadora
Prof^a. Dr^a. Patricia Pranke

Porto Alegre, abril de 2017.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Tese de doutorado

**DESENVOLVIMENTO DE UM SUBSTITUTO NANOESTRUTURADO A SER
UTILIZADO EM ASSOCIAÇÃO COM CÉLULAS-TRONCO PARA A
TERAPIA VASCULAR EM DOENÇA ARTERIAL PERIFÉRICA.**

Daikelly Iglesias Braghirolli

Tese realizada sob a orientação da Prof^a. Dr^a.
Patricia Pranke, apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul em
preenchimento parcial dos requisitos para a
obtenção do título de Doutora em Fisiologia.



Dedico

A todos os que me acompanharam e auxiliaram nessa etapa
Em especial aos meus pais, que tanto fizeram pelo meu crescimento pessoal e
profissional.

Agradecimentos

Aos meus pais, *Marley e Aldemar*, por todo o esforço, amor e carinho dedicados a mim e aos meus irmãos. Pelo incentivo constante e por fazerem o possível (e impossível) para que tivéssemos uma excelente educação.

Aos meus irmãos, *Aldemarzinho, Carlos e Thobias*, por todo o carinho e por todos os momentos especiais que compartilhamos.

À toda a minha família, em especial, aos meus avós *Laís e Carlos (in memorian)*, pela constata presença e apoio em todas as etapas da minha vida. Obrigada por todos os valores ensinados e dedicação voltados à minha educação.

Ao meu namorado, *Tales*, por todas as risadas e momentos que temos compartilhado. Pela admiração por meu trabalho, pelo apoio diário e compreensão pelas inúmeras vezes em que não pude lhe dar a devida atenção. Por estar sempre ao meu lado.

A todas as minhas queridas amigas e amigos, por todas as comemorações e desabafos. Por toda a torcida durante essa jornada. Por me fazerem melhor a cada dia.

À minha orientadora, *Prof^a. Patricia Pranke*, por ter me acolhido no “mundo científico”. Por todos os ensinamentos e oportunidades oferecidas, que tanto contribuíram para a minha formação. Por toda a credibilidade e incentivo depositado que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho e de um companheirismo que já perdura há nove anos.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Células-tronco, por toda a ajuda na realização desse trabalho e pela amizade cotidiana, que resulta em momentos de crescimento e alegria.

À *Virgínia Helfer e Bárbara Caberlon*, por toda ajuda durante o doutorado. Pela dedicação e competência durante a realização dos mais diferentes “experimentos”. Por toda a amizade.

Aos co-autores dos trabalhos gerados a partir dessa tese, *Prof. Dr. Douglas Gamba, Dr. Pedro Chagastalles, Dr. Tiago e Prof. Dr. Marcos Dias*, pela contribuição técnica e intelectual.

À técnica *Fabiana Grosser* e ao *Prof. Dr. César Petzhold*, pelas análises de GPC.

Às técnicas *Simone e Fernanda*, por manterem o bom funcionamento do laboratório. A ajuda de vocês é indispensável.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Biológicas: Fisiologia, pela excelência em ensino.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a bolsa de Doutorado.

Ao Instituto de Pesquisa com Células-tronco pelo apoio financeiro, contribuindo com a aprendizagem e formação de profissionais mais capacitados.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho,

Muito obrigada!

Sumário

Apresentação	7
Resumo	8
Abstract	10
Lista de abreviaturas e siglas	12
Lista de figuras	15
1. Introdução	17
2. Revisão bibliográfica	20
2.1. Doenças arteriais periféricas	20
2.2. Engenharia de tecidos	22
2.3. Desenvolvimento de biomaterial vascular pela técnica de <i>electrospinning</i>	23
2.4. Biomoléculas e funcionalização de biomateriais vasculares	28
2.5. Copolímeros de carbonato de trimetileno	31
2.6. Tipos celulares utilizadas na engenharia de tecidos vasculares	33
2.7. Cultivo dinâmico de células nos biomateriais	39
3. Objetivos	42
3.1. Objetivo geral	42
3.2. Objetivos específicos	42
4. Resultados	43
4.1. Capítulo I	43
4.2. Capítulo II	60
4.3. Capítulo III	79
5. Discussão	102
6. Conclusão	117
7. Perspectivas	119
8. Referências bibliográficas	120
9. Anexos: outras publicações realizadas durante o período de doutorado	128

Apresentação

A presente tese foi desenvolvida no laboratório de Hematologia e Células-Tronco da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no laboratório de Células-Tronco do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da mesma universidade.

O Instituto de Pesquisa com Células-Tronco (IPCT), o Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) foram os órgãos fomentadores do trabalho.

Resumo

Atualmente, existe uma grande necessidade médica por enxertos vasculares de pequeno calibre (< 6 mm), que possam ser utilizados em cirurgias de reconstrução vascular. Nesse trabalho, dois tipos de biomateriais vasculares foram desenvolvidos pela técnica de *electrospinning*: biomateriais de policaprolactona (PCL) e biomateriais de poli(carbonato de trimetileno – *co* – ácido láctico) (PTMCLLA). Os biomateriais de PCL foram funcionalizados com heparina e com VEGF (PCL/Hep/VEGF). Os biomateriais de PTMCLLA foram desenvolvidos a partir de três razões de carbonato de trimetileno/ ácido láctico: 20/80, 30/70 e 40/60.

Os biomateriais de PCL apresentaram taxa de degradação lenta e alta elasticidade. A funcionalização dos biomateriais preveniu a coagulação do sangue e também favoreceu o crescimento de células-tronco mesenquimais (CTMs) e de células progenitoras endoteliais (CPEs) nessas estruturas. A análise de PCR demonstrou que o VEGF adsorvido aos biomateriais não foi suficiente para diferenciar as CTMs em células endoteliais. O cultivo das CPEs sobre os biomateriais aumentou a expressão de VE-caderina e a presença de VEGF nas estruturas manteve o nível de expressão de CD31 e CD34 nessas células. Após essas análises, os biomateriais de PCL/Hep/VEGF foram fabricados em formato tubular. As CPEs foram semeadas no lúmen do biomaterial, através de biorreatores de parede rotatória (BPR), e mantidas em cultivo, por biorreatores de perfusão (BP). O BPR favoreceu a distribuição homogênea das CPEs na parede luminal dos biomateriais enquanto que o BP estimulou seu crescimento e otimizou seu metabolismo energético.

Os biomateriais produzidos a partir dos copolímeros de PTMCLLA 30/70 e 40/60 exibiram uma alta flexibilidade. Porém, os biomateriais de PTMCLLA 40/60 tiveram um grande enrugamento. Os biomateriais de PTMCLLA 30/70 suportaram a adesão e o crescimento de CTMs, de CPEs e de células musculares lisas.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que biomateriais de PCL/Hep/VEGF apresentam características físico-químicas compatíveis para o uso vascular. Ainda, previnem a formação de trombos em sua superfície e propiciam o desenvolvimento da camada endotelial em seu lúmen. Os biomateriais de PTMCLLA 30/70 exibem alta flexibilidade e suportam o desenvolvimento de células vasculares e de células-tronco mesenquimais. De acordo com esses resultados, é possível concluir que

biomateriais de PCL/Hep/VEGF e de PTMCLLA 30/70 são candidatos promissores para aplicação como enxertos vasculares.

Palavras-chaves: engenharia de tecidos vasculares, células progenitoras endoteliais, biomateriais vasculares, poli(carbonato de trimetileno – *co* – ácido láctico), poli(caprolactona)

Abstract

Currently, there is a great medical need for small caliber vascular grafts (<6 mm), which can be used in vascular replacement surgeries. In this work, two types of vascular biomaterials were developed by the electrospinning technique: biomaterials of polycaprolactone (PCL) and biomaterials of poly(trimethylene carbonate-*co*-L-lactide) (PTMCLLA). PCL biomaterials were functionalized with heparin and VEGF (PCL / Hep/VEGF). The PTMCLLA biomaterials were developed from three ratios of trimethylene carbonate/lactide: 20/80, 30/70 and 40/60. The PCL biomaterials presented a slow degradation rate and high elasticity. The functionalization of the biomaterials prevented the blood from clotting and also favored the growth of mesenchymal stem cells (MSCs) and endothelial progenitor cells (EPCs) in these structures. PCR analysis demonstrated that VEGF adsorbed by the biomaterials was not sufficient to differentiate the MSCs into endothelial cells. The cultivation of CPEs on the biomaterials increased their expression of VE-cadherin and the presence of VEGF in the structures maintained the cell expression of CD34 and CD31. After these analyzes, the PCL/Hep/VEGF biomaterials were produced in a tubular geometrical form. The CPEs were seeded into their lumen by rotating bioreactors (RB) and maintained in culture by perfusion bioreactors (PB). The RB favored the homogeneous distribution of the CPEs in the luminal wall of the biomaterials while the BP stimulated their growth and optimized their energetic metabolism.

The biomaterials produced from the PTMCLLA 30/70 and 40/60 copolymers exhibited high flexibility. However, the PTMCLLA 40/60 biomaterials exhibited substantial wrinkling. The PTMCLLA 30/70 biomaterials supported the adhesion and growth of MSCs, CPEs and smooth muscle cells.

This study has demonstrated that PCL/Hep/VEGF biomaterials have physicochemical characteristics compatible with vascular use. Furthermore, they prevent thrombus formation on their surfaces and promote the development of the endothelial layer in their lumen. Biomaterials of PTMCLLA 30/70 exhibit high flexibility and support the development of vascular and mesenchymal stem cells. According to these results, it can be concluded that PCL/Hep/VEGF and PTMCLLA 30/70 biomaterials are promising candidates for use as vascular grafts.

Key-words: vascular tissue engineering, vascular biomaterials, endothelial progenitor cells, poly(trimethylene carbonate-*co*-L-lactide), poly(caprolactone)

Lista de abreviaturas e siglas

Ac-LDL	Lipoproteína de baixa densidade acetilada
ANOVA	Análise de variância
APTT	do inglês <i>Activated partial thromboplastin time</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CACs	do inglês <i>Circulating angiogenic cells</i>
CCK-8	do inglês <i>Cell Counting Kit-8</i>
CPEs	Células progenitoras endoteliais
CT	Células-tronco
CTEs	Células-tronco embrionárias
CTMs	Células-tronco mesenquimais
DAPI	do inglês <i>4,6-diamidino-2-fenylindole dihydrochloride</i>
DAPs	Doenças arteriais periféricas
DCM	Diclorometano
DMA	do inglês <i>Dynamic mechanical analysis</i>
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
early EPCs	do inglês <i>Early endothelial progenitor cells</i>
ECM	do inglês <i>Extracellular matrix</i>
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide
EGM	do inglês <i>Endothelial cell growth medium</i>
EPCs	do inglês <i>Endothelial progenitor cells</i>
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
FBS	do inglês <i>Fetal bovine serum</i>
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FGF-2	do inglês <i>Fibroblast growth factor 2</i>
FITC	do inglês <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
fvW	Fator de von Willebrand
G-CSF	do inglês <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GPC	do inglês <i>Gel Permeation Chromatograph</i>
HCl	Ácido clorídrico
Hep	Heparina
Hepes	n-2 hidroxietil piperazine- n' - 2 ácido sulfônico etano

HGF	do inglês <i>Hepatocyte growth factor</i>
ICMI	Isquemia crítica dos membros inferiores
IGF-1	do inglês <i>Insulin-like growth factor</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
iNOS	do inglês <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
iPSCs	do inglês <i>Induced pluripotent stem cells</i>
KDR	do inglês <i>Kinase insert domain receptor</i>
Klf4	do inglês <i>Kruppel-like factor 4</i>
LDH	do inglês <i>Lactate dehydrogenase</i>
LE	do inglês <i>Loading efficiency</i>
MEC	Matriz extracelular natural
MSCs	do inglês <i>Mesenchymal stem cells</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NHS	N-hydroxysuccinimide
NO	do inglês <i>Nitric oxid</i>
Oct-3/4	do inglês <i>Octamer-binding transcription factor 3/4</i>
OECs	do inglês <i>Late outgrowth endothelial cells</i>
PAD	do inglês <i>Peripheral arterial disease</i>
PBS	do inglês <i>Phosphate buffer solution</i>
PCL	Poli(caprolactona)
PCR	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i>
PIGF	do inglês <i>Placental growth factor</i>
PLLA	poli(L-ácido láctico)
PTMC	do inglês <i>Poly(trimethylene carbonate)</i>
PTMCLLA	do inglês <i>Poly(trimethylene carbonate – co –L- lactide)</i>
rpm	Rotações por minuto
SDF-1	do inglês <i>Stromal cell-derived gactor 1</i>
SEM	do inglês <i>Scanning electron microscopy</i>
SOX2	do inglês <i>(Sex determining region Y)-box 2</i>
TGA	do inglês <i>Thermogravimetric analysis</i>
UCB	do inglês <i>Umbilical cord blood</i>

UEA	do inglês <i>Ulex europaeus agglutinin I</i>
UV	Ultravioleta
VEGF	do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	do inglês <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
Wnt	do inglês <i>Wingless-related integration site</i>
7AAD	7-Amino Actinomycin D

Lista de figuras

- Figura 1.** Número anual de publicações envolvendo o termo “*electrospinning and vascular scaffolds*”, disponíveis na base de dados *Pubmed*, até março de 2017.
- Figura 2.** Representação do aparato básico de *electrospinning* (A) e da formação do cone de Taylor (B) (adaptado de Braghirolli et al, 2014).
- Figura 3.** Aparato de *electrospinning* equipado com mandril rotatório. O mandril é utilizado como prato coletor (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).
- Figura 4.** Representação da estrutura química da poli(caprolactona).
- Figura 5.** Representação da estrutura química da heparina (retirado de Lehninger, 6^a Ed).
- Figura 6.** Representação esquemática de biomateriais de PCL funcionalizados com heparina e com VEGF.
- Figura 7.** Representação dos processos de degradação por erosão de superfície e por erosão em bloco (adaptado de Bat e colaboradores, 2014).
- Figura 8.** Estrutura química do poli(carbonato de trimetileno-*co*-ácido lático) (“x” representa as unidades de carbonato de trimetileno e “y” as unidades de ácido lático).
- Figura 9.** Organização e composição celular da parede arterial (adaptado de Huang e Li, 2008 e Silverthorn, 5^a Ed).

Figura 10. Morfologia de células progenitoras endoteliais precoces (A) e tardias (B) durante seu cultivo *in vitro* (retirado de Smadja e colaboradores, 2007).

Figura 11. Câmara para biorreator (a), biorreator rotativo (b), esquema ilustrativo de um biorreator de perfusão (c) e biorreator de perfusão (d) (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

1. Introdução

As doenças arteriais periféricas são caracterizadas pela obstrução de artérias periféricas e redução do aporte sanguíneo aos tecidos. Em casos graves, procedimentos cirúrgicos são realizados com o objetivo de restaurar o fluxo sanguíneo (1). Nesses procedimentos, homoenxertos ou implantes sintéticos são utilizados como substitutos do vaso lesado. Contudo, quando vasos de pequeno diâmetro (diâmetro interno < 6 mm) são acometidos, a taxa de falha desses substitutos é bastante alta, principalmente para os enxertos sintéticos (2). Dessa forma, novos enxertos vasculares devem ser desenvolvidos para o tratamento desse quadro.

A engenharia de tecidos é uma ciência que visa à reconstrução de tecidos lesados através da associação de biomateriais, células e moléculas bioativas. Os biomateriais atuam como suportes para o crescimento celular, sendo chamados de matrizes ou *scaffolds*. Essas matrizes fornecem a estrutura para que as células possam se desenvolver, secretar matriz extracelular e organizar o tecido a ser regenerado. Enquanto isso, as moléculas bioativas auxiliam as células a desempenharem suas funções (3). Devido a essas características, a engenharia de tecidos tem atraído grande atenção como uma ferramenta para o desenvolvimento de substitutos vasculares.

O endotélio vascular, camada mais interna dos vasos sanguíneos, desempenha diferentes funções relacionadas à homeostasia vascular (4). Dessa forma, o desenvolvimento da camada endotelial no interior do biomaterial vascular é crucial para o bom desempenho do mesmo. As células-tronco mesenquimais e as células progenitoras endoteliais têm sido bastante investigadas como fontes celulares para a formação do endotélio na parede luminal de substitutos vasculares. As células-tronco mesenquimais são células-tronco adultas que apresentam facilidade de obtenção e cultivo. Essas células apresentam grande plasticidade e, se adequadamente estimuladas, podem se diferenciar em células endoteliais (5). Enquanto isso, as células progenitoras endoteliais são células que apresentam uma alta taxa de proliferação e um grande potencial de vasculogênese. Elas contribuem direta e indiretamente para a formação e reparo do endotélio vascular (6).

Diferentes técnicas têm sido empregadas para a produção dos biomateriais. O método de *electrospinning* caracteriza-se pela produção de biomateriais poliméricos formados por fibras que mimetizam fisicamente a matriz extracelular natural, proporcionando um microambiente favorável ao desenvolvimento celular (7). Os

polímeros utilizados nessa técnica devem ser escolhidos de acordo com as características que os biomateriais devem apresentar. Para a construção de biomateriais vasculares, devem ser utilizados polímeros que confirmem resistência mecânica e também elasticidade aos mesmos. A poli(caprolactona) (PCL) é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível, já aprovado pelo órgão americano que regulamenta o uso de alimentos e medicamentos, *Food and Drug Administration* (FDA), para uso em humanos. A PCL apresenta características físico-químicas como elasticidade, resistência mecânica e uma taxa de degradação relativamente lenta, compatíveis para aplicação na engenharia de tecidos vasculares (8). Contudo, assim como outros polímeros sintéticos, a PCL apresenta uma baixa bioatividade. Para minimizar essa limitação, moléculas bioativas podem ser ligadas aos biomateriais produzidos com esse polímero (9).

A heparina é um anticoagulante natural que pode ser ligada a biomateriais sintéticos para conferir propriedade antitrombogênica aos mesmos (10). Enquanto isso, o fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) é um peptídeo com funções angiogênicas e vasculogênicas. O VEGF ocasiona a quimiotaxia de células endoteliais e aumenta a sua proliferação (11). Assim, a funcionalização de biomateriais com heparina e com o VEGF propicia a regeneração vascular e o sucesso da aplicação dos mesmos. A heparina evita a formação de trombos e a obstrução do lúmen do biomaterial e o VEGF favorece a sua endotelização.

Devido à grande necessidade clínica por enxertos vasculares de pequeno diâmetro, novos materiais devem ser desenvolvidos. O poli(carbonato de trimetileno) é um polímero biodegradável do tipo elastômero, isto é, apresenta um elevado grau de elasticidade. Em função disso, os copolímeros de carbonato de trimetileno (TMC) têm sido bastante estudados para produção de materiais que sofrem deformações cíclicas constantes (12). O poli(carbonato de trimetileno-co-L-ácido láctico) (PTMCLLA) é um copolímero formado por unidades de TMC e de ácido láctico, que conferem, respectivamente, grande elasticidade e resistência aos materiais (13). Devido a essas características, o PTMCLLA é um polímero interessante para a produção de enxertos vasculares.

O uso de biorreatores para cultivo *in vitro* de células em biomateriais vasculares melhor simula o microambiente natural encontrado nos vasos sanguíneos (14). Os biorreatores possibilitam a passagem de meio de cultivo pelo lúmen desses biomateriais, expondo as células às forças mecânicas normalmente encontradas nas paredes dos vasos

(15). Assim, o uso desses dispositivos contribui para a maturação e para a funcionalidade dos substitutos vasculares desenvolvidos pela engenharia de tecidos.

Nesse contexto, o presente trabalho científico visa ao desenvolvimento de biomateriais endotelizados, a partir dos polímeros PCL ou PTMCLLA, que possam ser aplicados como substitutos vasculares em quadros graves de doença arterial periférica, utilizando os princípios da engenharia de tecidos.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Doenças arteriais periféricas

As doenças arteriais periféricas (DAPs) são manifestações clínicas secundárias à diminuição do aporte sanguíneo aos tecidos devido à obstrução da artéria aorta e/ou de seus ramos. As artérias mais comumente afetadas são aquelas localizadas nos membros inferiores, contudo, os vasos renais e de outros órgãos também podem ser acometidos (1). A principal causa da DAP é a lesão por arteriosclerose, a qual ocasiona a obstrução do fluxo sanguíneo no leito vascular e, conseqüentemente, privação de oxigênio e nutrientes nos tecidos irrigados (16). Esse quadro origina o aparecimento de sintomas, como dores e lesões nos membros afetados (1).

As DAPs apresentam diferentes graus clínicos de gravidade, que podem variar entre zero e seis, de acordo com escala de *Rutherford*. Conforme a intensidade da obstrução do vaso arterial, as DAPs podem ser assintomáticas (categoria zero) ou até mesmo causar lesões tróficas nos membros acometidos (categoria seis) (17). Um sintoma inicial bastante frequente em pacientes com DAP é a dor nas pernas ao caminhar, chamada claudicação intermitente (18, 19). Esse sintoma impede que os indivíduos consigam realizar grandes caminhadas, causando grande morbidade e impactando a qualidade de vida dos mesmos. A evolução desse sintoma ocasiona o quadro “isquemia crítica dos membros inferiores” (ICMI), caracterizado por lesões de pele e dores nas pernas e pés, mesmo em repouso. Esse quadro, se não adequadamente tratado, pode acarretar a necrose dos tecidos e, então, a amputação dos membros (1).

Estudos demonstram que as DAPs são bastante prevalentes na população, acometendo mais de 200 milhões de pessoas no mundo, provenientes tanto de países desenvolvidos como de países em desenvolvimento (20, 21). A prevalência das DAPs aumenta com a idade, sendo inferior a 10% em pessoas com idades entre 55 e 59 anos e chegando a quase 60% em pessoas com idades entre 85 e 89 anos (22). A maioria dos indivíduos sintomáticos para a DAP – que apresentam claudicação intermitente – permanecem com o quadro clínico estável. Contudo, cerca de 20% desses pacientes apresentam progressão da doença, desenvolvendo o quadro de ICMI. Aproximadamente 1 a 2% dos indivíduos com ICMI são submetidos à amputação. Esse risco é ainda maior em diabéticos, atingindo cerca de 5% dos indivíduos (18, 19).

O tratamento do indivíduo diagnosticado com DAP visa à melhora de sua qualidade de vida, focando na redução dos sintomas relatados e na prevenção da amputação de membros (23). Assim, o tratamento é realizado de acordo com a gravidade do quadro clínico apresentado e inclui exercícios físicos, intervenções farmacológicas (Aspirina[®], Clopidrogel, Cilostazol) e procedimentos cirúrgicos de revascularização, em quadros mais graves, onde existe a obstrução crônica do vaso (24, 25). Nesse caso, a cirurgia de ponte, ou *by-pass*, é bastante empregada. Nesse procedimento, um enxerto vascular é utilizado para substituir ou contornar o vaso danificado (2, 26).

Atualmente, os vasos autólogos ainda são considerados padrão ouro para uso como enxertos vasculares nos procedimentos cirúrgicos de revascularização e reconstrução vascular. As artérias radial e mamária e a veia safena são os vasos normalmente utilizados como enxertos autólogos nas cirurgias de ponte (26, 27). Contudo, a aplicação de enxertos autólogos é bastante limitada devido às suas desvantagens intrínsecas, tais como trombose no sítio cirúrgico e disponibilidade limitada. Muitos pacientes não possuem vasos disponíveis para “auto-doação” em função de operações prévias ou, ainda, não apresentam vasos de “boa qualidade” para uso como enxerto (28). Além disso, esse método requer dois procedimentos cirúrgicos, um para a obtenção do vaso a ser utilizado como enxerto autólogo e outro para sua implantação no local da lesão (29).

Alternativamente, enxertos vasculares sintéticos, produzidos a partir de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) ou poliésteres, como o tereftalato de polietileno (Dacron[®]), têm sido utilizados satisfatoriamente no reparo de artérias de médio e grande calibre. No entanto, esses enxertos mostram-se inadequados para a aplicação em vasos de menores diâmetros (< 6 mm). Estudos têm demonstrado que os enxertos sintéticos apresentam um grande grau de obstrução quando utilizados em vasos de pequeno calibre, mesmo com pouco tempo após sua aplicação (2). As baixas velocidades de fluxo sanguíneo em vasos com diâmetros inferiores a 6 mm implicam a necessidade de implantes sintéticos com diferentes características daqueles utilizados em veias e artérias de maiores calibres (29, 30). Entre as principais causas de falha desses materiais estão a trombogenicidade e a excessiva hiperplasia da íntima no local do implante. Além disso, em geral, os implantes sintéticos apresentam biocompatibilidade limitada e propriedades mecânicas inadequadas (31). Assim, o uso desses enxertos no reparo de vasos de pequenos diâmetros ainda é insatisfatório. Dessa forma, novas estratégias devem ser

pesquisadas para o estabelecimento do fluxo sanguíneo, quando esses vasos são acometidos.

2.2. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é uma ciência multidisciplinar que, através da união de princípios da biologia e das engenharias, visa à criação de substitutos capazes de restaurar, manter ou aumentar a função de um determinado tecido (32). Essa ciência combina o uso de biomateriais, células e moléculas bioativas para regeneração de tecidos e/ou órgãos. Nesse sistema, as células apresentam como função principal a síntese de matriz extracelular, que formará o novo tecido. Os biomateriais, por sua vez, atuam como suportes temporários, denominados matrizes ou *scaffolds*. Essas matrizes proporcionam às células uma estrutura tridimensional onde elas podem se organizar, proliferar e diferenciar (3). Além de orientar o desenvolvimento celular, os biomateriais auxiliam a manter as células no local implantado, favorecendo o recrutamento celular *in situ*, pois minimizam a perda de células pela corrente circulatória, uma vez que as mesmas encontram-se já aderidas a eles (33). Assim, o biomaterial guia as células para que sua proliferação e a secreção de matriz extracelular ocorram no local desejado. Enquanto isso, as moléculas bioativas podem ser fatores de crescimento, fármacos ou outras biomoléculas que auxiliam as células a desempenharem suas funções e estimulam sua proliferação e/ou diferenciação (3, 34).

Devido a essas características, a engenharia de tecidos apresenta-se como uma solução para diferentes quadros envolvendo danos a tecidos ou órgãos e que, ainda, não apresentam uma terapia adequada (7, 35, 36). Ela é uma estratégia bastante atraente para o desenvolvimento de novos enxertos vasculares, principalmente para a aplicação em vasos de pequenos diâmetros. A associação de células autólogas aos biomateriais biodegradáveis possibilitam a construção de estruturas vasculares que, quando implantadas *in vivo*, podem degradar-se ao mesmo tempo em que células vasculares se proliferam, produzem a matriz extracelular e regeneram o vaso lesado. Dessa forma, espera-se que essa combinação entre células e biomateriais possa levar ao reestabelecimento do tecido e à formação de vasos funcionais (37, 38).

Diferentes tipos de biomateriais naturais e sintéticos têm sido desenvolvidos para aplicação na engenharia de tecidos. O mesmo ocorre com as tecnologias para seu processamento (39). A escolha do biomaterial e da tecnologia para sua produção deve ser

baseada nas características do tecido que se deseja reparar (33). O ideal é que, além de biocompatíveis, os biomateriais apresentem características físico-químicas semelhantes ao tecido natural e que consigam integrar-se a esse, quando implantado. Além disso, eles devem suportar o crescimento e as necessidades biológicas da população celular encontrada naquele ambiente (40).

O desenvolvimento de biomateriais vasculares é bastante complexo. Para que haja sucesso em sua aplicação, um biomaterial vascular deve apresentar uma série de características, tais como: baixo risco de infecções, patência de longo prazo, resistência à degradação e ao procedimento de sutura, resistência mecânica e elasticidade, responsividade a estímulos fisiológicos, bem como porosidade adequada para que ocorra a difusão de nutrientes e a migração celular. Por outro lado, ao mesmo tempo, o biomaterial vascular deve impedir o extravasamento de seu conteúdo, bem como apresentar custo/benefício adequado e ser de fácil produção. Além disso, os biomateriais vasculares não devem desencadear resposta imunológica ou liberar produtos tóxicos, devem evitar a formação de trombos em seu lúmen e devem favorecer o desenvolvimento de células vasculares (28, 37). Portanto, um biomaterial vascular deve ser biomimético ao vaso em que será inserido.

Dentre as tecnologias que têm sido empregadas na engenharia de tecidos vasculares, a técnica de eletrospiação, ou *electrospinning*, tem se destacado (30, 41, 42). Essa técnica apresenta a vantagem intrínseca de produzir biomateriais fibrosos que naturalmente conseguem mimetizar fisicamente a matriz extracelular das células (7).

2.3. Desenvolvimento de biomaterial vascular pela técnica de *electrospinning*

O *electrospinning* é uma técnica bastante versátil, pela qual biomateriais poliméricos, formados por fibras de diferentes diâmetros, são produzidos. Apesar de ter sido patenteada ainda em 1934, essa técnica somente despertou interesse comercial a partir da década de 90 (43). A partir desse ponto, um número crescente de trabalhos envolvendo *electrospinning* vem sendo realizado nas mais diferentes áreas, incluindo a engenharia de tecidos (7). O interesse pela aplicação da técnica especificamente na engenharia de tecidos vasculares é mais recente. De acordo com uma busca realizada em março de 2017 na base de dados *Pubmed*, foi possível observar um maior número de trabalhos envolvendo o termo “*electrospinning and vascular scaffolds*”, somente a partir do ano de 2010 (Figura 1).

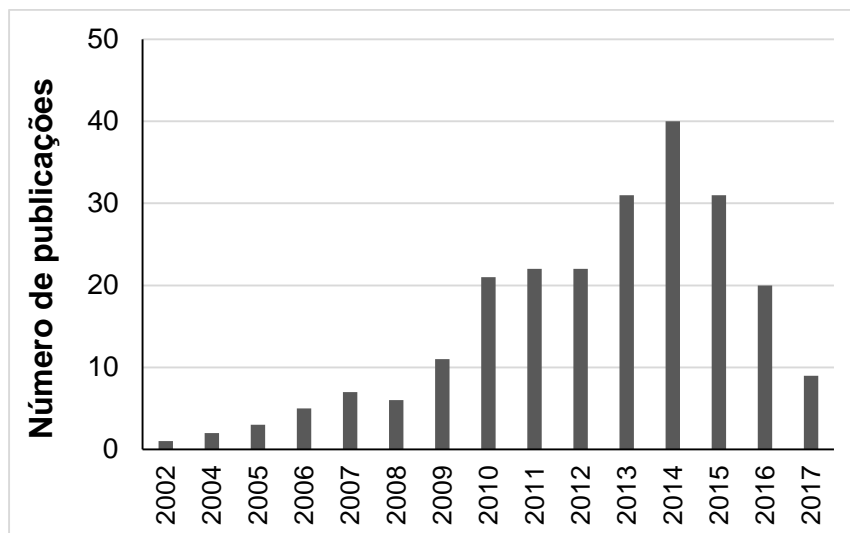


Figura 1. Número anual de publicações envolvendo o termo “*electrospinning and vascular scaffolds*”, disponíveis na base de dados *Pubmed*, até março de 2017.

O *electrospinning* tem seu funcionamento baseado no princípio eletrostático, onde uma alta tensão elétrica é aplicada a um polímero, na forma de solução. Portanto, o aparato de *electrospinning* é composto por uma fonte de alta tensão, uma bomba peristáltica, uma seringa acoplada a uma agulha e um “prato coletor”, local onde os biomateriais são formados (Figura 2a).

Para a produção dos biomateriais, a fonte de alta tensão é conectada à agulha da seringa e ao prato coletor, através de um eletrodo e um contra eletrodo, respectivamente. A solução polimérica é acondicionada na seringa e, então, é ejetada pela bomba peristáltica. Devido ao campo elétrico gerado, à medida que a solução polimérica é ejetada, ela é carregada eletricamente e, em função disso, se deforma, adquirindo uma forma cônica, chamada de cone de Taylor (Figura 2b). Em consequência à alta densidade de cargas elétricas, o cone colapsa, formando fibras líquidas bastante finas. Essas fibras são atraídas pelo contra eletrodo. Durante esse processo, o solvente da solução polimérica evapora e, então, fibras sólidas são depositadas no prato coletor (44).

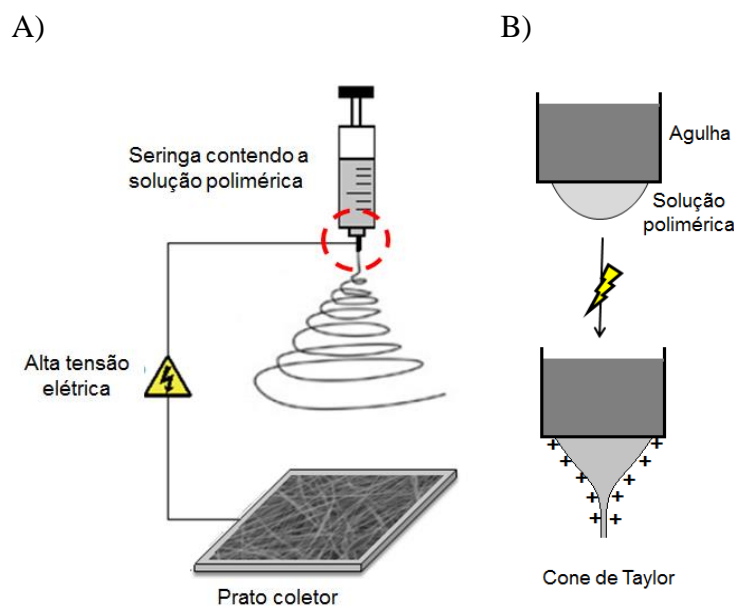


Figura 2. Representação do aparato básico de *electrospinning* (A) e da formação do cone de Taylor (B) (adaptado de Braghirolli et al, 2014).

As fibras formadas por *electrospinning* podem apresentar diâmetros que variam desde 3 nanômetros até alguns micrômetros. A sua superfície pode ser lisa, rugosa ou porosa, como também pode apresentar estruturas em forma de gotas, chamadas contas, mais comumente conhecidas como *beads*. As diferentes morfologias e diâmetros das fibras produzidas são obtidas pela modulação dos parâmetros que coordenam o processo de *electrospinning*. A concentração e a condutividade da solução polimérica, o peso molecular do polímero, a tensão elétrica utilizada, a distância entre a ponta da agulha e o prato coletor e a velocidade da bomba peristáltica são fatores que interferem na formação e na morfologia das fibras (45). Assim, através do ajuste desses fatores, fibras com morfologia e diâmetros semelhantes às fibras de colágeno da matriz extracelular (MEC) natural podem ser obtidas. Além de mimetizarem estruturalmente a MEC, os biomateriais produzidos por *electrospinning* apresentam um grande número de poros interconectados, que favorecem a passagem de nutrientes e oxigênio, a eliminação de metabólitos e a migração celular. Ainda, as fibras constituem um biomaterial com elevada área superficial em relação ao seu volume, o que favorece a adesão, adaptação e proliferação celular (7).

A técnica de *electrospinning* também permite que biomateriais com diferentes formatos possam ser produzidos. Para a engenharia de tecidos vasculares, biomateriais já

com formato tubular podem ser obtidos utilizando um mandril rotatório. Esse mandril atua como prato coletor (Figura 3) (46). Nesse caso, as fibras são homogeneamente depositadas sobre o cilindro em rotação, adquirindo o formato tubular.

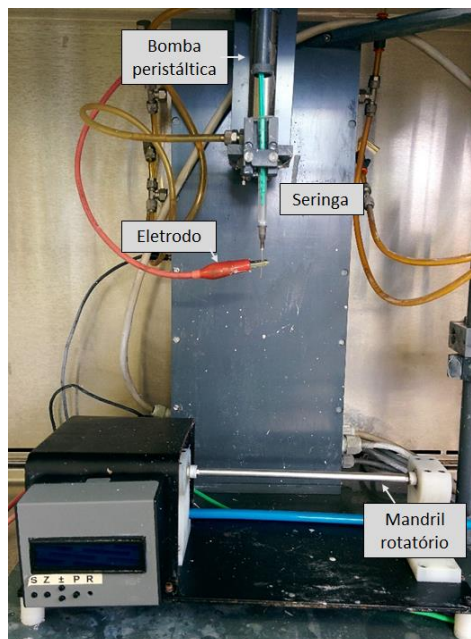


Figura 3. Aparato de *electrospinning* equipado com mandril rotatório. O mandril é utilizado como prato coletor (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

Através do *electrospinning*, os biomateriais podem ser produzidos a partir de uma grande variedade de polímeros naturais ou sintéticos. Como citado anteriormente, esses polímeros devem ser escolhidos de acordo com as características necessárias do tecido que se pretende reparar. Portanto, para a produção de substitutos vasculares, devem ser utilizados polímeros com boa resistência mecânica e também elasticidade. Assim, os biomateriais gerados apresentarão complacência compatível com a dos vasos naturais e capacidade de suportar o estresse hemodinâmico a longo prazo, sem sofrer deformações permanentes (29).

Os polímeros naturais como colágeno, elastina e gelatina são reconhecidos por sua intrínseca bioatividade. Por apresentarem domínios naturais para adesão celular, os biomateriais produzidos com esses polímeros apresentam boa interação com diferentes tipos de células. Contudo, os polímeros naturais são bastante frágeis e não resistem a grandes pressões ou tensões, o que os torna inadequados para o uso na produção de enxertos que exijam resistência mecânica (46, 47).

Enquanto isso, uma gama muito grande de polímeros sintéticos, com diferentes características físico-químicas, é oferecida. Os polímeros sintéticos podem ser adaptados para que exibam as características físico-químicas de interesse. Seu peso molecular e composição podem ser alterados para que apresentem propriedades mecânicas ou taxas de degradação adequadas à finalidade que serão utilizados. Além disso, esses polímeros apresentam uma grande estabilidade, tendo pouca variabilidade entre lotes (47, 48). Assim, esses polímeros têm sido extensivamente utilizados na engenharia de tecidos vasculares.

2.3.1. Poli(caprolactona)

A poli(caprolactona) (PCL) é um polímero sintético, biodegradável e biocompatível, que faz parte da classe dos poliésteres alifáticos. Ela é um polímero já aprovado pelo FDA para algumas aplicações médicas, como sistemas de liberação de fármacos e fios de sutura (Monocryl®) (8, 49). Sua fórmula química é $(C_6H_{10}O_2)_n$ e sua estrutura está demonstrada na figura 4.

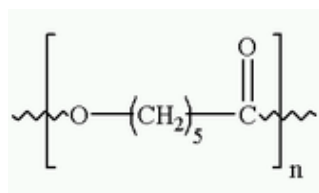


Figura 4. Representação da estrutura química da poli(caprolactona).

A PCL é hidrofóbica e apresenta solubilidade em diferentes solventes orgânicos. Essa propriedade permite que diferentes soluções, com diferentes características, possam ser produzidas com esse polímero e utilizadas na técnica de *electrospinning*. Sua degradação ocorre pela hidrólise das ligações ésteres. Contudo, a taxa de degradação desse polímero é bastante baixa (50). Em função disso, a PCL tem sido investigada para a produção de dispositivos que devam permanecer implantados por longos períodos de tempo, tais como, os biomateriais vasculares. As propriedades mecânicas da PCL, como alta elasticidade e resistência à pressão, também justificam o interesse à PCL para essa aplicação. Já foi mostrado que biomateriais de PCL apresentam uma alta taxa de alongação, podendo apresentar uma deformação superior a 100% em relação ao seu tamanho original, antes da fratura (51). Essas estruturas também são capazes de suportar picos de pressão de até 4000 mmHg, superior aos vasos sanguíneos naturais (em torno de

2000 mmHg) (52). Dessa forma, acredita-se que os biomateriais de PCL sejam resistentes ao estresse hemodinâmico e apresentem elasticidade adequada à aplicação na engenharia de tecidos vasculares.

Assim, como outros polímeros sintéticos, a PCL apresenta uma baixa bioatividade. Embora alguns estudos já tenham mostrado que estruturas produzidas com PCL suportem a adesão de células endoteliais (53, 54), esse polímero não apresenta domínios naturais para a ligação celular em sua estrutura, além de ser bastante hidrofóbico (55). Dessa forma, a adesão e a proliferação de células nos biomateriais de PCL podem ser prejudicadas. Uma estratégia que vem sendo utilizada para minimizar esse problema, é a associação desses biomateriais a fatores de crescimento ou outras moléculas bioativas. A funcionalização dos biomateriais sintéticos, isto é, a ligação de moléculas à sua superfície, agrega propriedades aos mesmos e melhora sua bioatividade, favorecendo a adaptação celular (7, 9).

2.4. Biomoléculas e funcionalização de biomateriais vasculares

Como descrito anteriormente, a engenharia de tecidos é baseada na tríade: biomateriais, células e moléculas bioativas. Não necessariamente os três fatores precisam ser utilizados simultaneamente. Estratégias que recrutam as células do hospedeiro, ou que fazem uso dos próprios fatores liberados no processo de dano tecidual, podem ser utilizadas (3). Entretanto, quando células, biomateriais e biomoléculas já são previamente combinados, o processo de regeneração tecidual é acelerado.

A associação de moléculas bioativas a biomateriais pode ser realizada de diferentes formas, tais como, encapsulação ou ligação química. Esse último processo é conhecido por funcionalização e se dá pela ligação covalente ou pela adsorção eletrostática das biomoléculas à superfície dos biomateriais (9).

A escolha da biomolécula a ser utilizada deve ser baseada nas necessidades do tecido que se quer reparar. Uma das maiores causas da falha de enxertos vasculares em vasos de pequeno calibre é a formação de trombos em seu interior. Portanto, o uso de fatores que previnam a trombose pode evitar esse quadro.

A heparina é um polissacarídeo altamente sulfatado, pertencente à família dos glicosaminoglicanos. Ela é produzida e armazenada principalmente por mastócitos. Sua molécula apresenta uma alta densidade de cargas negativas, maior que qualquer outra macromolécula biológica conhecida (Figura 5). A heparina é utilizada como agente

terapêutico devido a sua capacidade de inibir a coagulação sanguínea, sendo indicada, inclusive, em casos de DAPs (graus 0 a 3) (17). Sua ação se dá pela ligação à antitrombina, o que ocasiona a mudança de conformação dessa proteína e aumento de sua afinidade pela trombina e pelo fator Xa de coagulação. A ligação da antitrombina a esses fatores ocasiona o bloqueio das vias intrínseca e comum da cascata de coagulação (56).

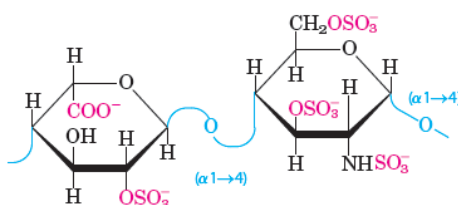


Figura 5. Representação da estrutura química da heparina (retirado de Lehninger, 6ª Ed).

Devido à sua propriedade anticoagulante, a heparina tem sido estudada para funcionalização de biomateriais vasculares. A presença desse polissacarídeo na estrutura desses materiais confere a característica antitrombogênica aos mesmos (10, 57). Além da ação direta sobre a antitrombina, a alta densidade de cargas negativas na estrutura da heparina previne a sua interação com algumas proteínas. O fibrinogênio é uma proteína que também atua na coagulação sanguínea e, no pH fisiológico, é carregado negativamente. Portanto, devido à repulsão eletrostática existente, as estruturas tratadas com heparina não adsorvem fibrinogênio, mecanismo que também contribui para a prevenção da formação de trombos na superfície desses materiais (58).

Um outro efeito conhecido da heparina é sua ação sobre a proliferação de células musculares lisas. O grupo do pesquisador Su demonstrou que a liberação controlada de heparina por nanofibras de poli(lactideo-co-caprolactona) ocasionou a redução da proliferação de células musculares lisas sobre a sua superfície. Esse também é um efeito importante para a engenharia de tecidos vasculares, pois a hiperplasia íntima também ocasiona a falha dos enxertos de vasos (59).

Ao mesmo tempo que a superfície “negativa” dos biomateriais tratados com heparina previne a adsorção de certas proteínas, ela favorece a interação com outras. Assim, esse fator pode ser utilizado para a “co-funcionalização” de biomateriais, isto é, a presença da heparina nos biomateriais é aproveitada para que moléculas catiônicas sejam também ligadas à superfície dos mesmos (60, 61). Ye e colaboradores demonstraram que biomateriais produzidos com o conjugado PCL-heparina apresentaram uma maior

eficiência de adsorção do fator de crescimento de fibroblasto-2 (FGF-2) do que biomateriais produzidos com PCL (10). Ainda, a heparina auxilia a preservar a bioatividade das proteínas ligadas a ela, protegendo-as da degradação enzimática e térmica (60).

No âmbito da engenharia de tecidos vasculares, o uso de fatores de crescimento ou proteínas que favoreçam a endotelização dos biomateriais é bastante interessante. O crescimento de células endoteliais na superfície luminal de enxertos vasculares é um fator que contribui para o bom desempenho dos mesmos (62).

O VEGF é um peptídeo que tem papel fundamental nos processos de vasculogênese e angiogênese (63). A vasculogênese é o processo de criação de vasos sanguíneos *de novo*, ou seja, a formação de novos vasos, baseado em angioblastos e células progenitoras endoteliais circulantes. Enquanto isso, a angiogênese refere-se ao processo de brotamento de novos vasos a partir de células endoteliais adultas, provenientes de um vaso pré-existente (64).

A família VEGF é constituída por seis membros, incluindo o VEGF-A, B, C, D, E e o fator de crescimento placentário (PIGF). Desses, O VEGF-A, referido apenas como VEGF, é o membro mais bem caracterizado. Ele apresenta diferentes isoformas, tais como VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆. O VEGF é expresso praticamente em todos os tipos de células adultas humanas, mas é secretado principalmente por células estromais e pericitos de sistemas capilares fenestrados (63). Sua ação ocorre principalmente sobre células endoteliais. Essas células apresentam em sua superfície dois tipos de receptores para o VEGF (VEGFR, do inglês *vascular endothelial growth factor receptor*), o VEGFR-1, também chamado de Flt-1, e o VEGFR-2, também chamado KDR (65).

Quando existe um quadro de hipóxia tecidual, a transcrição do gene para VEGF é aumentada. O VEGF, então, é secretado e tem suas ações sobre as células endoteliais, causando o aumento da permeabilidade do endotélio e a promoção da angiogênese (64). O VEGF causa a migração de células endoteliais até o local da hipóxia e também estimula a sua proliferação (61). Em função dessas ações, a associação de VEGF a biomateriais já tem sido bastante estudada na engenharia de tecidos com o objetivo de promover a vascularização do tecido danificado (60, 66). Contudo, o uso de VEGF mostra-se interessante também para a engenharia de tecidos vasculares. O grupo de Anderson e colaboradores aplicou hidrogéis de alginato impregnados com VEGF em ratos, pela via intramuscular. Após 48h da aplicação, uma grande quantidade de células endoteliais foi

encontrada no local (11). Portanto, a presença de VEGF em biomateriais vasculares também pode contribuir para a promoção da sua rápida endotelização luminal.

Tendo como base essas informações, neste trabalho, biomateriais de PCL foram produzidos por *electrospinning* e funcionalizados com heparina e VEGF através de ligação covalente e adsorção eletrostática, respectivamente. A representação do biomaterial desenvolvido é mostrada na figura 6.

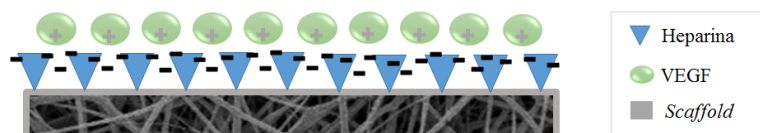


Figura 6. Representação esquemática de biomateriais de PCL funcionalizados com heparina e com VEGF.

2.5. Copolímeros de carbonato de trimetileno

Como já descrito, atualmente, a clínica médica não dispõe de enxertos vasculares adequados à aplicação em vasos de pequeno diâmetro. Dessa forma, novos materiais devem ser pesquisados e criados para que apresentem o máximo das características exigidas para a regeneração vascular e para que, assim, contemplem essa necessidade clínica.

O poli(carbonato de trimetileno) (PTMC) é um elastômero biodegradável. Os elastômeros são também chamados de “polímeros tipo borrachas” e são caracterizados por sua alta elasticidade. O PTMC é dito um polímero de memória, isto é, quando ele é deformado, tem a capacidade intrínseca de retornar completamente à sua forma original (12). Em função dessa propriedade, o PTMC tem sido estudado na engenharia de tecidos, para a construção de materiais que são submetidos a estresses cíclicos, como por exemplo, válvulas cardiovasculares e próteses cartilaginosas (67).

Uma outra característica interessante do PTMC que o torna interessante à engenharia de tecidos, é seu tipo de degradação. Além de apresentar uma baixa taxa de degradação, esse polímero degrada-se por erosão de superfície. Isto é, a redução das dimensões e massa de dispositivos de PTMC ocorre de maneira proporcional à redução de sua área superficial. Com isso, a estrutura e as propriedades mecânicas de tais dispositivos permanecem inalteradas por um longo período de tempo. Enquanto isso, os poliésteres, tais como a PCL, apresentam degradação em bloco. Nesse caso, a massa e as

dimensões dos dispositivos permanecem inalteradas por um período de tempo e após, toda a sua estrutura é rompida (Figura 7). Com isso, ocorre a perda de todas as suas propriedades, o que pode levar à falha do biomaterial (67).

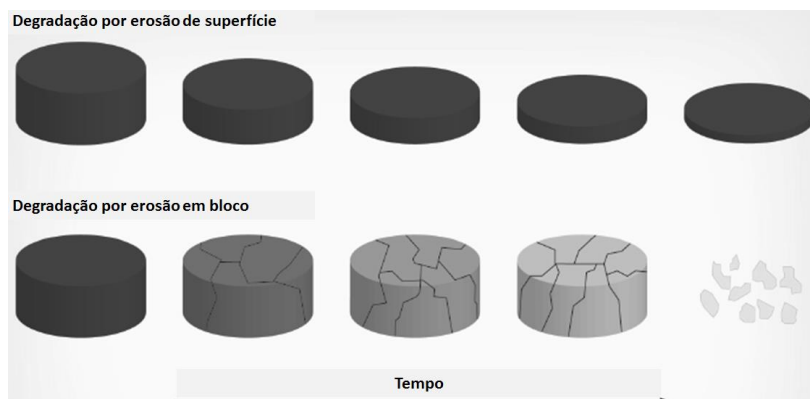


Figura 7. Representação dos processos de degradação por erosão de superfície e por erosão em bloco (adaptado de Bat e colaboradores, 2014) (67).

O uso do PTMC para o desenvolvimento de biomateriais vasculares de pequeno diâmetro é bastante interessante. Esses biomateriais devem suportar o estresse hemodinâmico por um tempo adequado, até que o tecido vascular possa ser gerado, sem perder suas propriedades, como a elasticidade.

A biocompatibilidade desse polímero já foi demonstrada através do estudo da interação de células-tronco mesenquimais e biomateriais que continham PTMC (68). Tais biomateriais não foram citotóxicos para esse tipo celular. A hemocompatibilidade de filmes de PTMC também já foi avaliada. Yang e colaboradores demonstraram que filmes de PTMC apresentam uma baixa taxa de hemólise, demonstrando sua compatibilidade com o sangue humano (69).

Normalmente, o PTMC apresenta um baixo peso molecular, o que dificulta a sua eletrofição. Essa desvantagem pode ser contornada pela combinação de PTMC a outros polímeros. Já foi demonstrado que polímeros contendo unidades de carbonato de trimetileno e ácido lático foram utilizados com sucesso na técnica de *electrospinning* para produção de biomateriais (70). A copolimerização dessas unidades monoméricas faz com que as propriedades desses polímeros também sejam combinadas. Além de possibilitar a eletrofição, a combinação de unidades de poliésteres dá maior força mecânica ao carbonato de trimetileno (71). Enquanto isso, o carbonato de trimetileno confere elasticidade e degradação por erosão de superfície aos seus copolímeros.

No presente trabalho, copolímeros contendo unidades de carbonato de trimetileno e ácido láctico – poli(carbonato de trimetileno-*co*-ácido láctico) – foram sintetizados e investigados para a produção de biomateriais vasculares. A estrutura do poli(carbonato de trimetileno-*co*-ácido láctico) (PTMCLA) está demonstrada na figura 8.

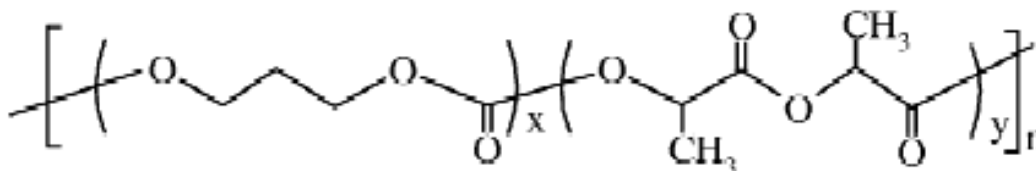


Figura 8. Estrutura química do poli(carbonato de trimetileno-*co*-ácido láctico) (“x” representa as unidades de carbonato de trimetileno e “y” as unidades de ácido láctico).

2.6. Tipos celulares utilizadas na engenharia de tecidos vasculares

A parede das artérias sanguíneas é formada por três camadas identificáveis, cada uma composta por células e proteínas específicas (Figura 9). A camada mais interna de todos os vasos sanguíneos, a túnica íntima, é formada por uma monocamada de células endoteliais, o endotélio. Adjacente ao endotélio, é encontrada a membrana basal, formada por colágeno IV e laminina, seguida pela lâmina elástica interna, uma camada de elastina. A segunda camada da parede arteriolar é chamada túnica média. Essa camada é formada por células musculares lisas e por colágenos tipo I e III, principalmente. A túnica média pode apresentar espessura variável de acordo com o tipo de vaso sanguíneo. A artéria aorta e seus ramos principais apresentam paredes rígidas e elásticas. Enquanto isso, artérias menores apresentam uma parede mais muscular. Essa camada é responsável pelo tônus muscular, desempenha vasoconstrição e vasodilatação e é delimitada pela lâmina elástica externa, uma segunda camada de elastina. A túnica adventícia é a camada mais externa da parede das artérias. Ela é constituída por tecido conjuntivo frouxo, contendo fibroblastos, colágeno e fibras elásticas (72, 73).

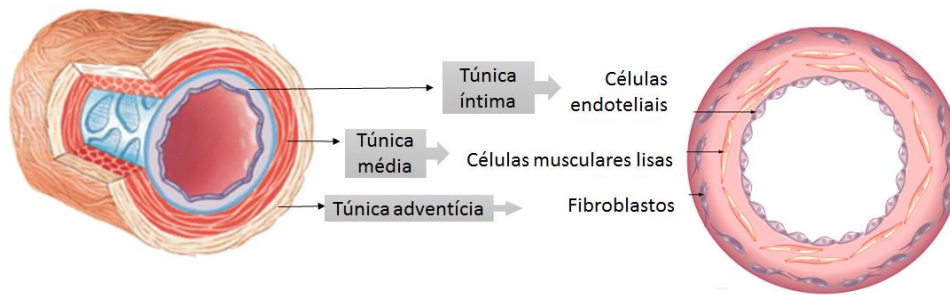


Figura 9. Organização e composição celular da parede arterial (adaptado de Huang e Li, 2008 e Silverthorn, 5ª Ed).

Para que consigam promover uma regeneração tecidual adequada, originando um tecido funcional, os biomateriais devem promover a organização celular e tecidual semelhante àquela presente nos vasos sanguíneos naturais. Portanto, devem ser compatíveis com o crescimento de células endoteliais, células musculares lisas e fibroblastos.

Na engenharia de tecidos de enxertos vasculares, o primeiro foco é estabelecer o endotélio na superfície interna do biomaterial, devido ao papel crucial que essa camada desempenha sobre a homeostasia vascular. As células endoteliais secretam diferentes fatores como fator ativador de plasminogênio, trombomodulina, sulfato de heparana, prostaciclina (PGI₂) e óxido nítrico, fazendo com que a camada endotelial apresente propriedades anticoagulantes e antitrombogênicas (4). O endotélio participa da regulação do processo inflamatório, da permeabilidade vascular, da trombose e fibrinólise, controlando as interações do fluxo sanguíneo com a parede do vaso. O endotélio também exerce um importante papel sobre o controle da proliferação e migração das células musculares lisas da túnica média. Dessa forma, a endotelização dos biomateriais é determinante para o sucesso de sua aplicação. Ela previne a formação de trombos e a hiperplasia íntima nos enxertos vasculares sintéticos (74). O estudo de Quint e colaboradores demonstrou o benefício da pré-endotelização de *scaffolds*. No estudo, a semeadura de células endoteliais ou de células progenitoras endoteliais em biomateriais contribuiu para a redução da hiperplasia íntima e favoreceu a permeabilidade ao fluxo sanguíneo quando os mesmos foram testados *in vivo* (62).

Dois grupos principais de células têm sido testados para a formação do endotélio em biomateriais vasculares: as células-tronco e as células vasculares diferenciadas (26). O primeiro grupo inclui células-tronco embrionárias, células-tronco pluripotentes induzidas e células-tronco mesenquimais. Enquanto isso, as células endoteliais e as

células progenitoras endoteliais são células vasculares bastante pesquisadas para endotelização de enxertos (38, 75).

2.6.1. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco (CT) são um tipo celular não especializado, com capacidade de autorrenovação e que podem manter-se por longos períodos de tempo com o potencial de diferenciação em uma linhagem celular com funções especializadas. Essas características fazem com que as CT representem uma parcela muito importante da medicina regenerativa e da engenharia de tecidos (76).

Basicamente, as células-tronco são divididas em células-tronco pluripotentes e células-tronco adultas. As células-tronco pluripotentes podem originar qualquer tipo de célula que compõe o organismo humano adulto. São células-tronco pluripotentes, as células-tronco embrionárias (CTEs) e as células-tronco pluripotentes induzidas, mais conhecidas como iPSCs (do inglês “*induced pluripotent stem cells*”). As CTEs são obtidas a partir de embrião de até 5 dias e, devido a sua elevada plasticidade, apresentam um grande potencial para uso na medicina regenerativa. Contudo, seu uso apresenta algumas limitações relacionadas principalmente a sua complexa regulação e implicações éticas (77). Uma alternativa às CTEs, são as iPSCs. As iPSCs são originadas a partir de células adultas, já especializadas, que passam a apresentar características de células-tronco embrionárias após reprogramação genética. Nesse processo, genes de pluripotência, como *Oct-3/4*, *SOX2*, *c-Myc*, and *Klf4* são adicionados às células adultas. A partir disso, elas passam a apresentar autorrenovação e plasticidade, da mesma forma que as CTEs (75). Esse ainda é um procedimento bastante complexo e que apresenta algumas desvantagens como a baixa eficiência de reprogramação e, também, o uso de vetores para a integração dos genes na célula hospedeira (77).

As células-tronco adultas, por sua vez, são células-tronco encontradas em órgãos ou tecidos já formados. As células-tronco mesenquimais (CTMs), ou também comumente chamadas de células estromais mesenquimais, são células-tronco adultas que têm sido alvo de muitas pesquisas devido à sua disponibilidade, plasticidade e facilidade de obtenção e cultivo (76). Além disso, a pesquisa e utilização das CTMs apresentam menores implicações bioéticas que as CTEs e também, menor complexidade de trabalho do que as iPSCs.

Inicialmente, as CTMs foram encontradas na medula óssea. Atualmente, a presença dessas células já foi descrita em vários outros tecidos como tecido adiposo,

cordão umbilical, ligamento periodontal, polpa dentária e pulmões (78). As CTMs representam uma fração de reserva celular para a manutenção e reparo de tecidos. Elas permanecem nos tecidos em um estado quiescente até serem ativadas por mediadores de lesão ou por processos naturais de senescência (79).

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular, podem ser classificadas como células-tronco mesenquimais, as células que apresentam as seguintes características: (a) aderência ao plástico, (b) expressão de marcadores de superfície como CD73, CD90 e CD105, (c) não expressão de marcadores de células hematopoéticas como: CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 e HLA-DR e (d) capacidade de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (80).

As CTMs apresentam alta plasticidade, sendo caracterizadas como multipotentes. Essas células podem se diferenciar em diferentes tipos celulares como os que originarão ossos, cartilagens, músculos, derme, gordura e estroma de medula óssea. Assim, as CTMs podem ser utilizadas para o reparo de diversos tecidos, incluindo os vasos sanguíneos. Estudos já demonstraram que, se adequadamente estimuladas, as CTMs podem ser diferenciadas em células endoteliais (5, 81). O VEGF é um dos principais fatores utilizados para essa diferenciação e tem sido empregado de diferentes maneiras: solubilizado no meio de cultura, liberado a partir de dispositivos de liberação controlada ou imobilizado em superfícies (77). Em seu trabalho, Wingate e colaboradores demonstraram que a combinação de VEGF solúvel e biomateriais elásticos agiram sinergicamente sobre CTMs, aumentando a expressão de marcadores típicos endoteliais nessas células (81).

Uma outra característica interessante das CTMs são suas ações parácrinas. As CTMs secretam um amplo espectro de moléculas bioativas com funções imunorreguladoras, que auxiliam a estruturação de um microambiente regenerativo (82). Essas moléculas incluem fatores angiogênicos e/ou vasculogênicos como VEGF-A, VEGF-B, bFGF, PlGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), Angiopoetina-1, Interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6). Assim, CTMs podem contribuir diretamente e indiretamente com a endotelização de biomateriais vasculares. Essas células podem colonizar a estrutura do biomaterial e se diferenciar em células endoteliais, bem como promover o recrutamento e proliferação de células endoteliais do próprio hospedeiro, através da secreção de fatores tróficos (83).

Devido a essas características, esse tipo celular foi avaliado no presente trabalho. Ele foi obtido a partir do tecido pulpar de dentes decíduos. O dente decíduo, popularmente

chamado de “dente de leite”, é uma fonte atraente para obtenção de CTMs visto que é um material que seria naturalmente descartado, sendo assim considerado um processo de obtenção pouco invasivo (84). Além disso, as CTMs de dentes decíduos são facilmente isoladas e cultivadas *ex vivo* e apresentam uma alta taxa de proliferação (85, 86).

2.6.2. Células progenitoras endoteliais

As células endoteliais têm sido amplamente associadas aos biomateriais vasculares para promoção de sua endotelização *in vitro*. Apesar dos bons resultados encontrados, alguns fatores limitam a sua real aplicação clínica. Essas células são isoladas a partir de vasos sanguíneos, sendo esse um processo bastante invasivo, que causa grande morbidade ao doador. Além disso, por tratar-se de células maduras, a sua expansão *in vitro* é bastante limitada (66, 87).

Mais recentemente, as células progenitoras endoteliais (CPEs) têm sido estudadas como fontes de células endoteliais autólogas para diferentes aplicações terapêuticas. As células progenitoras endoteliais foram isoladas pela primeira vez em 1997, por Asahara e colaboradores, a partir de sangue periférico, e foram descritas como uma população celular derivada da medula óssea, envolvida na neovascularização (88).

As CPEs têm sido classificadas por alguns autores como células-tronco adultas devido as suas propriedades de autorrenovação, alta taxa de proliferação, clonogenicidade e capacidade de diferenciação (89). As CPEs estão localizadas principalmente em nichos na medula óssea, mas também existe uma fração circulante dessas células no sangue periférico. Essas células representam 1% das células da medula óssea e menos de 0,01% das células mononucleares presentes no sangue periférico de indivíduos adultos (90). Apesar da baixa frequência, têm-se mostrado que essa fração celular pode ser facilmente isolada a partir da fração de células mononucleares de sangue periférico, sangue de cordão umbilical e medula óssea (6).

Duas populações de CPEs foram identificadas: as células progenitoras endoteliais precoces, chamadas “early EPCs” (*early endothelial progenitor cells*) ou “CACs” (*circulating angiogenic cells*) e as células progenitoras endoteliais tardias, conhecidas como “OECs” (*late outgrowth endothelial cells*). As CACs aparecem entre o 4º e 7º dia de cultivo *in vitro*, apresentam morfologia fusiforme (Figura 10a) e têm proliferação limitada, morrendo aproximadamente após 4 semanas de cultivo. As OECs são chamadas de CPEs verdadeiras, aparecem entre a 2ª e 4ª semana de cultivo *in vitro*, têm forma de paralelepípedo (*cobblestone*) (Figura 10b) e apresentam uma alta taxa de proliferação (91,

92). As CPEs podem ser identificadas pela co-expressão de marcadores de células-tronco hematopoéticas (CD34 e CD133) e marcadores de células endoteliais (CD31, eNOS, fvW e KDR) (11). Ainda, essas células apresentam a capacidade de internalizar lipoproteína de baixa densidade acetilada (Ac-LDL) e ligar-se à lecitina UEA (*Ulex europaeus agglutinin I*) (93).

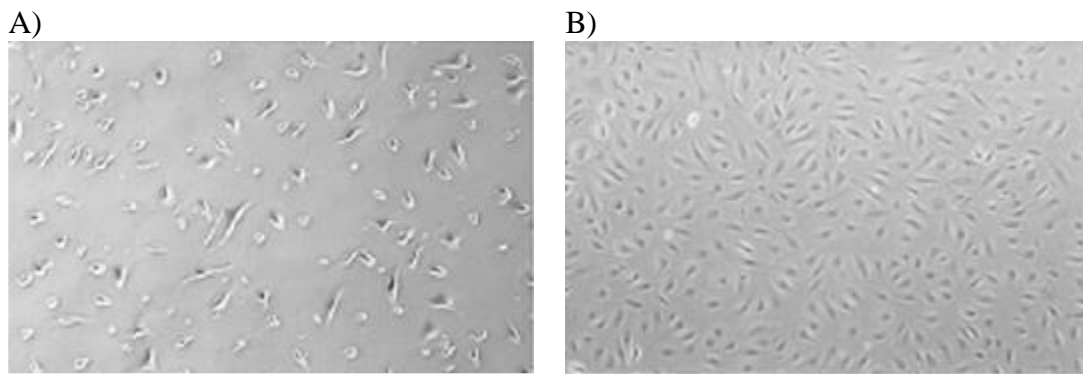


Figura 10. Morfologia de células progenitoras endoteliais precoces (A) e tardias (B) durante seu cultivo *in vitro* (retirado de Smadja e colaboradores, 2007).

A função das CPEs está relacionada à manutenção da hemostasia e reparo vascular. As CPEs são recrutadas a partir da medula óssea em situações de lesões na camada endotelial, quando contribuem diretamente e indiretamente para a formação e reparo do endotélio vascular (94). A ação direta dessas células se dá pela sua proliferação e diferenciação em células endoteliais maduras, que formam o tecido vascular. Além dessa ação, as células progenitoras endoteliais secretam diferentes citocinas pró-angiogênicas, que favorecem a proliferação e a migração de células endoteliais adultas, induzindo a vascularização. Entre as citocinas secretadas, estão o fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF), o indutor de óxido nítrico sintase (iNOS), o fator derivado de estroma-1 (SDF-1), o fator estimulante de colônias granulocitárias (G-CSF) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (6).

Diferentes grupos de pesquisas já demonstraram que o cultivo de células progenitoras endoteliais sobre biomateriais poliméricos é possível (53, 95). Assim, conforme as características descritas, as CPEs representam uma fonte celular bastante promissora para a engenharia de tecidos vasculares, podendo ser utilizadas para a endotelização de biomateriais nessa área da medicina regenerativa.

2.7. Cultivo dinâmico de células nos biomateriais

A combinação de células e biomateriais, ainda *in vitro*, permite a organização celular previamente à implantação desse sistema *in vivo*, podendo acelerar o processo de remodelamento e reparo tecidual. A incorporação das células aos biomateriais ocorre através do processo chamado de “semeadura”. A semeadura estática, ou de superfície, tem sido a técnica utilizada prevalentemente na engenharia de tecidos. Nessa técnica, as células são dispensadas com auxílio de uma micropipeta sobre a superfície do biomaterial (86, 96). Após a semeadura celular, as células são mantidas e expandidas sobre os biomateriais até que elas atinjam uma confluência adequada e/ou tenham produzido matriz extracelular para aplicação *in vivo*. Nessa etapa, o meio de cultivo é colocado sobre os biomateriais e trocado a cada 3 ou 4 dias.

Essas técnicas estáticas de semeadura e cultivo são de fácil execução e não requerem grande habilidade do manipulador. Contudo, essas técnicas não se mostram adequadas para alguns tipos de materiais, como por exemplo, os biomateriais com formato tubular. A semeadura e o cultivo estático não conseguem distribuir uniformemente as células na estrutura desse tipo de biomaterial (97). Além disso, essas técnicas não oferecem os estímulos mecânicos que estão presentes no ambiente *in vivo*. Consequentemente, apresentam dificuldades em criar um tecido funcional *in vitro* (15).

Os biorreatores são dispositivos nos quais processos biológicos e bioquímicos desenvolvem-se em condições ambientais e operacionais controladas (pH, pressão, temperatura). Na engenharia de tecidos, os biorreatores têm sido utilizados como um processo dinâmico de semeadura e cultivo celular (14). Nesses dispositivos, o meio de cultivo é passado continuamente pelas células e pelos biomateriais. Assim, eles conseguem melhor mimetizar o microambiente encontrado *in vivo*, oferecendo estímulos químicos e físicos para o desenvolvimento tecidual.

Os biorreatores são particularmente interessantes à engenharia de tecidos vasculares. Eles conseguem simular alguns estímulos fisiológicos existentes na parede dos vasos sanguíneos, como tensão de cisalhamento, tensão de estiramento e, até mesmo, pressão radial pulsátil (15). Além disso, o movimento do meio de cultura propicia um melhor transporte de nutrientes e de oxigênio (O₂), favorecendo o desenvolvimento uniforme das células por toda a estrutura do biomaterial (14).

Dois tipos principais de biorreatores têm sido utilizados para o cultivo de células em biomateriais vasculares: os biorreatores rotativos e os biorreatores de perfusão. Os

biorreatores rotativos, também chamados biorreatores de parede rotatória, consistem em câmaras onde os biomateriais tubulares são conectados. Essas câmaras giram a baixas velocidades, permitindo a transferência de massas pelas paredes interna e externa dos biomateriais (Figuras 11a e b). Enquanto isso, os biorreatores de perfusão apresentam uma câmara onde os biomateriais são conectados, um reservatório de meio de cultivo e uma bomba de perfusão. Nesse sistema, o meio de cultivo passa pelo lúmen do biomaterial, simulando o fluxo sanguíneo (Figuras 11c e d) (15). Os biorreatores rotativos são bastante utilizados para a sementeira de células na parede de biomateriais tubulares, enquanto que os biorreatores de perfusão são utilizados para a manutenção das células em cultivo (98, 99).

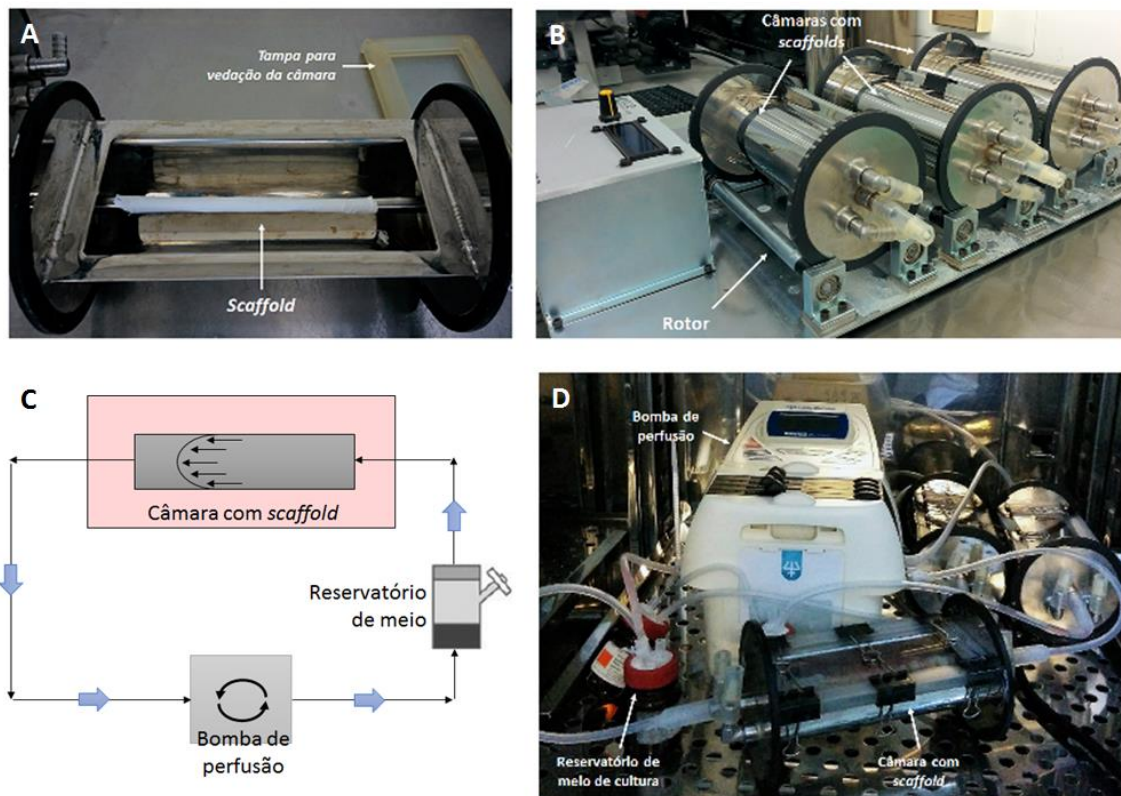


Figura 11. Câmara para biorreator (a), biorreator rotativo (b), esquema ilustrativo de um biorreator de perfusão (c) e biorreator de perfusão (d) (Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, UFRGS).

As células endoteliais que formam o endotélio vascular natural estão continuamente expostas à tensão de cisalhamento, originada a partir do fluxo sanguíneo.

Essa força mecânica é responsável pelo alinhamento das células na direção do fluxo e modula a sinalização de diferentes vias intracelulares e de mecanorreceptores específicos. Ainda, a tensão de cisalhamento gerada por um fluxo laminar de sangue estimula a produção de óxido nítrico pelas células endoteliais, uma molécula extremamente importante para a homeostase vascular. A expressão do fator KLF-2, envolvido na resposta anti-inflamatória e antitrombótica, das moléculas de adesão CD31 e VE-caderina, dos receptores para VEGF e a secreção da glicoproteína fator de Von Willebrand também são aumentadas em resposta à tensão de cisalhamento. (26). O escoamento do meio de cultura pelo biorreator de perfusão também gera uma tensão de cisalhamento, o que pode contribuir para o desenvolvimento da camada endotelial no lúmen do biomaterial vascular.

Diferentes autores têm demonstrado que as células progenitoras endoteliais também são sensíveis ao fluxo laminar de meio de cultura. Yamamoto e colaboradores demonstraram que a adesão, a proliferação e o potencial vasculogênico de células progenitoras endoteliais são aumentados quando as mesmas são submetidas a um cultivo dinâmico (100, 101). A passagem contínua de meio de cultura também faz com que as CPEs apresentem uma morfologia alongada em torno de seu eixo, na direção do fluxo (101). Ainda, a tensão de cisalhamento gerada pelo fluxo de meio de cultivo tem efeitos sobre diferentes vias de transdução celulares, modulando a expressão de marcadores típicos de células progenitoras endoteliais (102). Em seu trabalho, Obi e colaboradores demonstraram que o cultivo dinâmico de CPEs ocasionou o aumento da expressão dos marcadores KDR, Flt-1 e VE-Caderina nessas células (103).

Com base nisso, acredita-se que o uso de biorreatores favoreça o desenvolvimento de CPEs na estrutura de biomateriais vasculares e também contribua para a “maturação” e, conseqüentemente, maior funcionalidade desses sistemas.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Desenvolver um biomaterial vascular endotelizado, através da associação de biomateriais e células-tronco mesenquimais ou células progenitoras endoteliais, para aplicação como substituto vascular no tratamento de doença arterial periférica grave.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Produzir biomateriais pela técnica de *electrospinning*, utilizando os polímeros poli(caprolactona) e poli(carbonato de trimetileno-co-ácido láctico).
- 3.2.2. Funcionalizar os biomateriais de PCL com heparina e VEGF a fim de evitar a formação de trombos e auxiliar na endotelização de sua superfície;
- 3.2.3. Avaliar as propriedades físico-químicas dos biomateriais desenvolvidos;
- 3.2.4. Isolar, cultivar e caracterizar células-tronco mesenquimais obtidas a partir de dentes decíduos e células progenitoras endoteliais obtidas a partir de sangue de cordão umbilical e placentário humano;
- 3.2.5. Cultivar células-tronco mesenquimais e células progenitoras endoteliais nos biomateriais produzidos e avaliar a interação das células com o biomaterial, através de ensaios biológicos como adesão, proliferação, morfologia celular e citotoxicidade;
- 3.2.6. Desenvolver um biorreator para o cultivo dinâmico de células no interior de biomateriais vasculares tubulares;
- 3.2.7. Comparar os métodos de cultivo dinâmico e estático para a endotelização de biomateriais tubulares.

4. Resultados

4.1. Capítulo I

Electrospun scaffolds functionalized with heparin and VEGF increase the proliferation of endothelial progenitor cells

Daikelly Iglesias Braghirolli, Virgínia Etges Helfer, Pedro César Chagastelles, Tiago Pires Dalberto, Douglas Gamba e Patricia Pranke

Artigo publicado no periódico *Biomedical Materials*

4.2. Capítulo II

Dynamic endothelialization of electrospun scaffolds functionalized with heparin and VEGF with endothelial progenitor cells combining rotating and perfusion bioreactors

Daikelly Iglesias Braghirolli e Patricia Pranke

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Journal of biotechnology*

4.3. Capítulo III

Poly(trimethylene carbonate-*co*-lactide) electrospun scaffolds for use as vascular grafts

Daikelly Iglesias Braghirolli, Bárbara Caberlon, Douglas Gamba, Marcos L. Dias e
Patricia Pranke

Manuscrito submetido ao periódico *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*

5. Discussão

O presente trabalho teve por objetivo desenvolver biomateriais que pudessem ser utilizados como substitutos vasculares no tratamento cirúrgico das doenças arteriais periféricas. As DAPs constituem uma das desordens cardiovasculares mais prevalentes na população de países desenvolvidos e em desenvolvimento, afetando, principalmente, indivíduos com idade acima de 60 anos (21). Esse quadro clínico é caracterizado pela obstrução de vasos sanguíneos periféricos e, conseqüente oxigenação inadequada dos tecidos irrigados por ele (16). Em casos graves, onde ocorre a lesão/necrose do vaso, a intervenção cirúrgica pode ser necessária (25). Nesse caso, o vaso obstruído é substituído por um enxerto vascular (26, 28). Atualmente, a clínica médica apresenta uma grande necessidade por enxertos vasculares adequados, principalmente para a aplicação em vasos de pequeno diâmetro (29, 30). Devido às diferentes características apresentadas por esses vasos, quando os enxertos vasculares, principalmente sintéticos, são aplicados, apresentam um curto período de patência, precisando ser trocados em até 5 anos (74). Nesse contexto, novas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de enxertos vasculares.

A engenharia de tecidos tem se mostrado uma abordagem bastante interessante para o desenvolvimento de novos substitutos vasculares (35). Nessa ciência, biomateriais, células e moléculas bioativas são combinadas para a construção de estruturas que auxiliam a regeneração do tecido danificado (32, 36). Para a recuperação dos vasos lesados, biomateriais com características físico-químicas semelhantes às dos vasos naturais devem ser utilizados. Esses biomateriais são, então, associados a células vasculares a fim de se estabelecer uma organização celular e tecidual semelhante àquela existente *in situ* (37, 38, 73). Vários trabalhos disponíveis na literatura têm relacionado o sucesso da engenharia de tecidos vasculares à endotelização da superfície dos biomateriais (62, 74). O desenvolvimento de uma camada endotelial contínua e funcional no lúmen dos enxertos vasculares é crucial para a homeostase sanguínea. O endotélio vascular controla a interação do fluxo de sangue com a parede dos vasos, regulando os processos inflamatórios, a permeabilidade vascular, a cascata de coagulação e, até mesmo, a proliferação de células musculares lisas (4, 74). Assim, o endotélio contribui para a prevenção da formação de trombos e da hiperplasia intimal (74). Portanto, o

estabelecimento de uma camada endotelial confluyente na superfície de biomateriais representa o primeiro desafio da engenharia de tecidos vasculares.

Neste trabalho, dois tipos de biomateriais foram desenvolvidos para uso como substitutos vasculares, baseados nos princípios da engenharia de tecidos. No capítulo I foi mostrado que matrizes de policaprolactona, funcionalizadas com heparina e VEGF, apresentam propriedades antitrombogênicas e propiciam o desenvolvimento de células-tronco mesenquimais e de células progenitoras endoteliais em sua superfície. Esse trabalho teve como foco principal a caracterização desses biomateriais e a avaliação da sua interação com células que pudessem ser utilizadas para a formação de uma camada endotelial em sua superfície. No estudo, quatro grupos de biomateriais foram desenvolvidos pela técnica de *electrospinning*: biomateriais de PCL, biomateriais de PCL tratados com NaOH (PCL/NaOH), biomateriais de PCL tratados com NaOH e funcionalizados com heparina (PCL/Hep) e biomateriais tratados com NaOH e funcionalizados com heparina e VEGF (PCL/Hep/VEGF). Os dois primeiros grupos foram utilizados como controles da funcionalização.

A funcionalização da superfície dos biomateriais foi realizada com o intuito de aumentar a taxa de sucesso de sua aplicação. Sabe-se que uma das principais causas de falha dos enxertos vasculares é a oclusão de seu lúmen pela formação de trombos (29, 104). A heparina, ligada covalente à PCL, conferiu a propriedade antitrombogênica aos biomateriais (Capítulo I, Tabela I). Além disso, a presença dessa molécula aniônica na estrutura tridimensional favoreceu a adsorção do VEGF (Capítulo I, Figura 6). Esse fator de crescimento, por sua vez, desempenha importante papel sobre a vasculogênese, exercendo quimiotaxia e estimulando a proliferação de células endoteliais (63). O perfil de liberação do VEGF demonstrou que houve um pico de liberação nas primeiras 6 horas de avaliação, seguido por uma liberação sustentada do fator ao longo de 30 dias (Capítulo I, Figura 7). Esse perfil de liberação favorece a regeneração tecidual. A liberação de maiores quantidades de VEGF nas primeiras horas de aplicação *in vivo* ou cultivo *in vitro* favorece a adesão de células à superfície do biomaterial, enquanto que a sua liberação sustentada ao longo do tempo estimula a proliferação celular e auxilia na organização do tecido que está sendo formado (105).

Todos os biomateriais desenvolvidos apresentaram propriedades físico-químicas compatíveis com a aplicação vascular. Os biomateriais apresentaram fibras distribuídas homogeneamente por sua estrutura e que se assemelharam fisicamente às fibras de

colágeno da MEC (Capítulo I, Figura 2). Essa característica intrínseca das matrizes produzidas por *electrospinning*, associada à elevada área superficial dessas estruturas, contribuem para a adesão e crescimento celular (7).

A cinética de degradação dos biomateriais está intimamente relacionada à sua estabilidade *in vivo*, devendo ser avaliada na área da medicina regenerativa (106). O biomaterial deve apresentar uma taxa de degradação proporcional à taxa de regeneração do tecido ao qual é empregado. Assim, o biomaterial poderá suportar o desenvolvimento do tecido até que o mesmo esteja completamente formado, sem atrasar, ou até mesmo prejudicar, a sua regeneração (34). A biodegradação da PCL ocorre através da hidrólise de suas ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros ou monômeros (50). Como mostrado no capítulo I, os biomateriais de PCL apresentaram uma baixa taxa de degradação *in vitro*, mesmo após a hidrólise com NaOH (Capítulo I, Figura 3). Essa é uma característica bastante importante para a aplicação vascular dos biomateriais. Esse tipo de biomaterial deve apresentar estabilidade por maiores períodos de tempo para que as células tenham tempo hábil para se organizar, secretar quantidades suficientes de matriz extracelular e construir o tecido vascular (2, 14, 15).

Além disso, para que possam ser aplicados como substitutos vasculares, os biomateriais devem apresentar complacência e resistência à fratura (29). As propriedades mecânicas dos biomateriais são determinadas tanto pela sua macro e microestrutura física, como também pelas propriedades do polímero a partir do qual são produzidos (7). A PCL é caracterizada como um polímero de alta elasticidade e resistência à pressão (51, 52). A caracterização mecânica dos biomateriais produzidos demonstraram que essas características foram mantidas (Capítulo I, Figura 4). Os biomateriais de PCL apresentaram uma grande flexibilidade e uma alta capacidade de alongação até a fratura. Além disso, esses biomateriais apresentaram módulo de elasticidade semelhante ao dos vasos naturais. Esses resultados sugerem que os biomateriais desenvolvidos são capazes de resistir à deformação plástica, isto é, à deformação permanente, quando expostos às forças hemodinâmicas.

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes, podendo se diferenciar em diferentes tipos celulares, incluindo células endoteliais (5, 76, 81). Devido a essa característica e ao fato de poderem ser obtidas a partir de fontes pouco invasivas (84, 86), essas células são bastante interessantes para o desenvolvimento da camada endotelial em

matrizes vasculares (83). As CTMs foram capazes de se aderir e proliferar sobre os biomateriais desenvolvidos, sendo que os biomateriais de PCL/Hep e PCL/Hep/VEGF apresentaram um maior número dessas células no 15º dia de análise (Capítulo I, Figuras 8a e 9a). Além disso, a presença de heparina e de VEGF no biomaterial ocasionou o aumento do citoplasma celular, indicando uma boa adaptação das CTMs ao substrato (Capítulo I, Figuras 10 e 11).

Além de sua propriedade anticoagulante, a heparina tem a capacidade de se ligar a diferentes fatores não relacionados à cascata de coagulação sanguínea. Alguns estudos têm relatado que a heparina, presente em meios de cultura, potencializa a ação ou promove a sinalização de algumas biomoléculas, como FGF e Wnt, promovendo a proliferação celular *in vitro* (107, 108). Esse efeito foi demonstrado por Ling e colaboradores em CTMs. Os autores mostraram que a suplementação do meio de cultura com baixas doses de heparina (< 200 ng/mL) ocasiona a proliferação de CTMs humanas, provenientes de medula óssea (109). Tais resultados corroboram com os encontrados neste estudo. O VEGF também contribuiu sinergicamente para a proliferação desse tipo celular e ocasionou a sua melhor adaptação no biomaterial PCL/Hep/VEGF (Capítulo I, Figura 12). Atribui-se esse resultado à interação do VEGF com alguns receptores presentes em CTMs, como o receptor para PDGF, que, quando ativado, promove a migração celular (83).

Apesar de terem conseguido se organizar e adaptar sobre os biomateriais, a análise de expressão gênica demonstrou que, nas condições de cultivo utilizadas, as CTMs não se diferenciaram em células endoteliais. Diferentes estudos demonstram que o VEGF é fundamental para o processo de diferenciação de CTMs em células endoteliais (5, 77). Wingate e colaboradores também demonstraram que o uso de substratos macios e elásticos para o cultivo de CTMs age sinergicamente junto ao VEGF, nesse processo (81). Os meios de cultura utilizados para a diferenciação endotelial são suplementados com VEGF, em concentrações que variam de 10 a 50 ng/mL (5, 81). Nesse trabalho, o VEGF foi fornecido a partir do próprio biomaterial em que as células estavam sendo cultivadas. Assim, acredita-se que apesar da presença de um substrato elástico, a concentração de VEGF liberada no meio de cultura não foi suficiente para desencadear o processo de diferenciação celular. Apesar de não contribuírem diretamente para a endotelização, quando aplicadas *in vivo*, as CTMs podem propiciar a migração de células endoteliais do próprio hospedeiro em direção ao biomaterial, através de sua extensa ação

parácrina (83). Porém, essa ação demandaria um maior período de tempo para que a superfície luminal dos biomateriais fosse endotelizada, o que poderia limitar o seu sucesso de aplicação.

As células progenitoras endoteliais são uma população celular derivada da medula óssea e que apresentam uma ampla capacidade vasculogênica, superior às das células endoteliais maduras (74, 88). As CPEs podem se diferenciar em células endoteliais maduras, contribuindo diretamente com a endotelização de biomateriais, como também, podem causar a quimiotaxia de células endoteliais do hospedeiro em direção ao biomaterial implantado, através da secreção de diferentes fatores pró-angiogênicos e vasculogênicos (6, 94). Além disso, esse tipo celular exibe uma alta taxa de proliferação e de autorrenovação (89). Dessa forma, vários estudos têm investigado as CPEs como fontes celulares para a endotelização de enxertos vasculares (62, 74, 102, 110).

No estudo realizado, as CPEs humanas apresentaram uma boa adesão e um grande espalhamento do citoesqueleto sobre os biomateriais de PCL/Hep e, principalmente, sobre os biomateriais de PCL/Hep/VEGF (Capítulo I, Figuras 8b, 11 e 12). Ainda, os biomateriais funcionalizados com heparina e VEGF propiciaram o aumento significativo do número de EPCs durante o cultivo *in vitro*, superior aos demais grupos de biomateriais (1º e 7º dia de análise) (Capítulo I, Figura 9b). As CPEs apresentam receptores para VEGF (VEGFR-2) em sua membrana plasmática. A ativação desses receptores a partir da ligação com VEGF induz uma cascata de sinalização intracelular que propicia eventos angiogênicos e vasculogênicos (65). Portanto, acredita-se que a ligação das CPEs com o VEGF presente nos biomateriais ocasionou a ativação de mecanismos intracelulares que contribuíram para a melhor adaptação celular sobre essas estruturas. No 15º dia de cultivo, foi observado que o grupo de biomateriais funcionalizado apenas com heparina também propiciou um aumento da proliferação celular (Capítulo I, Figura 9b). Nesse ponto de análise, o número de CPEs viáveis foi semelhante entre os dois grupos de biomateriais funcionalizados: PCL/Hep e PCL/Hep/VEGF. Além de modular fatores que contribuem para a proliferação celular, a heparina é um glicosaminoglicano natural (111); logo, exibe domínios que podem ser reconhecidos pelas células, favorecendo a adaptação das mesmas. Ainda, Teran e Nugent demonstraram que a heparina age como um co-receptor para o VEGF, modulando a sinalização celular induzida por esse fator de crescimento (112). Esse efeito pode, portanto, ter contribuído para a ação do VEGF (presente no meio de cultura utilizado) sobre as células progenitoras endoteliais.

Apesar da presença de heparina e de VEGF ter melhorado as propriedades biológicas dos biomateriais desenvolvidos e estimulado a proliferação das EPCs, as placas de cultivo tratadas com colágeno (grupo controle) propiciaram um maior aumento do número de células do que esses biomateriais (Capítulo I, Figura 9b). Esse resultado demonstra que o contato desse tipo celular com proteínas da MEC aumenta sua proliferação. Embora a proliferação das EPCs tenha sido inferior nos biomateriais, os mesmos ocasionaram, nessas células, um aumento da expressão de VE-Caderina, em relação ao grupo controle (Capítulo I, Figura 14). A VE-caderina é uma proteína específica de células endoteliais e é responsável pelas junções aderentes entre células vizinhas. Essa proteína desempenha funções relacionadas à integridade do endotélio vascular, tendo papel importante na regulação de sua permeabilidade (113). O resultado obtido demonstrou que a estrutura tridimensional dos biomateriais desenvolvidos favoreceu o contato célula-célula em relação ao cultivo bidimensional (placa de cultura). Essa é uma característica bastante importante para a engenharia de tecidos, visto que a presença de VE-caderina deve contribuir para o desenvolvimento da camada endotelial na superfície dos biomateriais. A análise de expressão gênica também demonstrou que a presença de VEGF nos biomateriais manteve a expressão de CD31 e CD34 das CPEs (Capítulo I, Figura 14). Normalmente, quando CPEs são mantidas por maior tempo em cultivo *in vitro* elas se diferenciam em células endoteliais maduras, aumentando a expressão de CD31 e reduzindo a expressão de CD34 (101, 102). O estudo demonstrou que o contato com o VEGF, aderido à superfície dos biomateriais, fez com que a imaturidade das CPEs fosse conservada. Assim, as CPEs podem ser mantidas por maiores períodos de cultivo *in vitro*, se necessário, sem que percam suas características.

Apesar de a grande maioria dos trabalhos científicos da área da medicina regenerativa utilizar o método estático de cultivo, sabe-se que esse sistema apresenta grande limitação em termos de distribuição e crescimento não homogêneo das células na estrutura do biomaterial (97). Os biorreatores são dispositivos utilizados para o cultivo dinâmico *in vitro* de células em biomateriais e têm sido bastante empregados na engenharia de tecidos vasculares (14, 15). Esses dispositivos proporcionam uma distribuição e organização celular homogênea nos biomateriais e, ainda, melhor mimetizam as condições encontradas no microambiente natural dos vasos sanguíneos (114). O fluxo de meio de cultura, provocado pelos biorreatores, cria forças mecânicas, como a tensão de cisalhamento e de estiramento, contra a parede do biomaterial,

simulando alguns dos estímulos fisiológicos presentes no endotélio vascular (115, 116). Diferentes estudos disponíveis na literatura têm demonstrado que esses estímulos mecânicos são cruciais para a funcionalidade de substitutos vasculares (15, 26). A tensão de cisalhamento, por exemplo, aumenta a divisão de células endoteliais e contribui para a formação de uma camada endotelial homogênea na superfície luminal de enxertos vasculares (100, 101). Com base nisso, no capítulo II do presente trabalho, foi buscada uma maior eficiência de endotelização dos biomateriais de PCL/Hep/VEGF, através do uso de biorreatores. Para isso, os biomateriais de PCL funcionalizados com heparina e VEGF foram produzidos utilizando os mesmos parâmetros empregados no capítulo I, no entanto, foram construídos em formato tubular. As células progenitoras endoteliais foram associadas e mantidas nesses biomateriais através de biorreatores de parede rotatória e de perfusão, respectivamente.

Os biorreatores utilizados no trabalho foram desenvolvidos em parceria com a empresa DUO Engenharia. No projeto, foram buscadas características como: (a) fácil manuseio dos biomateriais nos biorreatores; (b) câmaras de cultivo que possibilitassem o cultivo isolado de cada biomaterial, evitando propagação de possíveis contaminações microbianas; (c) esterilização das câmaras de cultivo em autoclave; (d) capacidade do biorreator de parede rotatória gerar uma distribuição celular uniforme na parede luminal dos biomateriais; (e) capacidade do biorreator de perfusão gerar um fluxo laminar de meio de cultura no interior dos biomateriais; (f) possibilidade de cultivar células na parede externa dos biomateriais, em futuros experimentos e (g) manutenção da esterilidade do sistema durante todo o período de experimentação. As câmaras de cultivo desenvolvidas puderam ser utilizadas nos dois tipos biorreatores, evitando a manipulação dos biomateriais durante o cultivo dinâmico (Capítulo II, Figura 1a). Ainda, os biorreatores fabricados puderam ser totalmente colocados no interior de incubadoras, garantindo as condições de temperatura e umidade necessárias para o cultivo celular.

Os biorreatores de parede rotatória consistiram nas câmaras de cultivo dos biomateriais e em um rotor com velocidade de 1 rpm (Capítulo II, Figura 1b). O movimento rotacional gerado por esse sistema faz com que as células sejam jogadas contra a parede interna do biomaterial, propiciando uma distribuição celular uniforme nessa estrutura (15). Um estudo prévio desse grupo de pesquisa demonstrou que o tempo de 3 h de adesão é suficiente para que as células possam se aderir à superfície de biomateriais planos, produzidos pela técnica de *electrospinning* (117). Esse foi o tempo

utilizado para a adesão celular no trabalho exposto no capítulo I. Contudo, sob condições dinâmicas de semeadura, um maior intervalo de tempo pode ser requerido para que se estabeleça a adesão das células ao biomaterial. Na literatura, diferentes períodos de tempo (de 3 até 24 h) são empregados para o processo de adesão celular em biomateriais tubulares, sob o uso de biorreatores (99, 116, 118, 119). Em função disso, a adesão das CPEs foi avaliada após 3 e 24 h de semeadura e cultivo em biorreator de parede rotatória. Surpreendentemente, os biomateriais mantidos por 3 h nos biorreatores de parede rotatória apresentaram um maior número de células do que aqueles mantidos por 24 h nos dispositivos. A viabilidade celular foi semelhante para os dois períodos avaliados (Capítulo II, Figura 3). Acredita-se que o maior tempo de exposição à tensão rotacional dificultou a interação das CPEs ou ocasionou o seu destacamento da parede dos biomateriais. De acordo com esse resultado, assumiu-se que o período de tempo normalmente utilizado para a adesão celular estática pode ser mantido para as condições dinâmicas de semeadura, em biomateriais produzidos por *electrospinning*.

Após 3 h de incubação, os biomateriais já celularizados foram submetidos ao cultivo em biorreatores de perfusão. Para isso, as câmaras de cultivo, que continham os biomateriais, foram facilmente retiradas dos biorreatores de parede rotatória e conectadas a frascos com meio de cultura, através de mangueiras de silicone. Uma bomba de perfusão garantiu a passagem de meio de cultura pelo interior dos biomateriais, a uma velocidade de 1,7 mL/min (Capítulo II, Figura 1c). O cultivo dinâmico em biorreator de perfusão foi comparado ao cultivo estático. Através do cálculo do número de Reynolds, foi possível verificar que as condições utilizadas para o cultivo dinâmico geraram um fluxo laminar de meio de cultura no lúmen dos biomateriais (Número de Reynolds < 2.100). Nos vasos sanguíneos, o fluxo laminar é caracterizado pelo movimento do sangue em linhas de fluxo, sem a mistura das camadas de sangue e, idealmente, forma um perfil de fluxo parabólico. O fluxo laminar favorece a difusão homogênea de nutrientes, de O_2 e de produtos do metabolismo, no interior dos biomaterias (119, 120). Além disso, esse perfil de fluxo gera uma tensão de cisalhamento constante contra a parede dos biomateriais (121).

A tensão de cisalhamento constante é importante para que a formação da camada endotelial luminal não seja prejudicada e para que a parede dos biomateriais não apresente variações de espessura ao longo de seu comprimento, o que poderia acarretar a falha do substituto vascular (122). No presente trabalho, a tensão de cisalhamento foi de 3,8

dyn/cm². As células endoteliais encontradas *in situ* são expostas a tensões que variam de 5 a 20 dyn/cm² (26). A tensão de cisalhamento poderia ter sido aumentada através do aumento da velocidade de perfusão do meio de cultura. Contudo, quando essa medida foi adotada, houve escape de meio de cultura do lúmen do biomaterial para a câmara de cultivo do biorreator. Esse vazamento foi atribuído à recente celularização dos biomateriais desenvolvidos e a sua extensa rede de poros interconectados. Apesar do pequeno tamanho, esses poros possibilitam a chegada de meio de cultura por toda a espessura do biomaterial. Essa é uma característica bastante importante, pois possibilita as trocas metabólicas no sistema (123), porém, especificamente para enxertos vasculares, a camada endotelial deve cobrir toda superfície interna dos biomateriais a fim de regular a permeabilidade dos mesmos. Devido ao pouco tempo de interação das células com os biomateriais, não houve grande secreção e desenvolvimento de matriz extracelular sobre sua superfície luminal e os poros existentes na estrutura permaneceram totalmente abertos. Assim, quando velocidades de perfusão superiores a 1,7 mL/min foram utilizadas, a tensão do fluido contra a parede do biomaterial foi aumentada de tal forma que o meio de cultura acabou ultrapassando toda a sua espessura e se depositando na câmara de cultivo. Apesar de a tensão de cisalhamento presente no interior dos biomateriais ser inferior à encontrada *in situ*, ela foi suficiente para favorecer o desenvolvimento de células progenitoras endoteliais em sua parede luminal (Capítulo II, Figuras 4 e 6). Ainda, esse valor de tensão está de acordo com outros trabalhos disponíveis na literatura, que empregam tensões de cisalhamento ainda menores do que a utilizada no presente estudo e reportam sucesso no cultivo de células vasculares (15, 100, 115).

O biorreator de perfusão ocasionou o crescimento e a organização de CPEs na parede luminal dos biomateriais de PCL/Hep/VEGF. Apesar de não ter sido observada diferença significativa, os biomateriais cultivados em biorreator apresentaram um maior número de células viáveis do que os biomateriais cultivados estaticamente (Capítulo II, Figura 4). Esses efeitos são atribuídos à tensão de cisalhamento criada com o cultivo dinâmico de perfusão. Essa força mecânica atua sobre mecanorreceptores de células endoteliais maduras e de células progenitoras endoteliais, modulando seu comportamento (26). Yamamoto e colaboradores demonstraram que a tensão de cisalhamento (0,1 – 2,5 dyn/cm²) aumenta a proliferação de CPEs (100). Os autores mostraram que a exposição a essa força mecânica reduz o número de CPEs nas fases G₀ e G₁ do ciclo celular e aumenta o número de células nas fases G₂-M. Além disso, o mesmo trabalho demonstrou

que a tensão de cisalhamento também aumenta a expressão de receptores para VEGF e da molécula VE-caderina nessas células. Esses efeitos contribuem para organização celular e formação da camada endotelial, o que foi observado na análise de microscopia confocal desse estudo (Capítulo II, Figura 6). Essa análise demonstrou que as CPEs cultivadas dinamicamente apresentavam um maior contato entre elas. Ainda, elas já exibiam uma discreta orientação do seu citoesqueleto na direção do fluxo de meio de cultura, no 5º dia de análise. A elongação das células endoteliais em torno de seu próprio eixo contribui para a sua funcionalidade e previne seu destacamento da superfície dos biomateriais (26, 101). O trabalho de Quint e colaboradores demonstrou que biomateriais pré-cultivados dinamicamente com células progenitoras endoteliais apresentaram uma alta taxa de sucesso quando foram implantados na artéria carótida de porcos. Esses biomateriais apresentaram elevada taxa de patência e preveniram tanto a formação de trombos, como também, a hiperplasia intimal no local em que foram implantados (62).

O fluxo laminar existente no interior dos biomateriais celularizados favoreceu a difusão de glicose e de O_2 por essas estruturas. As CPEs cultivadas nos biomateriais através do biorreator de perfusão apresentaram um maior consumo de glicose e uma menor produção de lactato do que as células mantidas em cultivo estático (Capítulo II, Figura 5). Dois fatores podem estar relacionados ao maior consumo de glicose pelas CPEs cultivadas dinamicamente: (a) maior número de células presentes no biomaterial e (b) remodelamento de suas proteínas de adesão. O aumento do consumo de glicose pelas CPEs, durante o cultivo dinâmico, provavelmente acompanhou o aumento da densidade celular nos biomateriais. Além disso, como sugerido por Ciechanowska e colaboradores, as células mantidas em condições dinâmicas de cultivo precisam reorganizar constantemente suas proteínas de adesão, o que gera um maior consumo de energia (116).

O uso de glicose pelas células pode se dar pela via glicolítica aeróbica e pela via glicolítica anaeróbica. No metabolismo aeróbico, a glicose é totalmente degradada até H_2O e CO_2 e gera uma grande quantidade de ATP (30 – 32 moléculas), através da fosforilação oxidativa. Enquanto isso, na privação de O_2 , a glicose é convertida em lactato e uma menor quantidade de ATP é gerada (2 moléculas) (111). A baixa produção de lactato pelas CPEs cultivadas dinamicamente sugere que a glicose foi utilizada principalmente pela via glicolítica aeróbica, diferente das células mantidas em cultivo estático, que produziram uma alta quantidade de lactato. Dessa forma, é possível inferir que o uso do biorreator garantiu uma melhor distribuição de O_2 pelo biomaterial,

possibilitando que a fosforilação oxidativa da glicose pudesse acontecer. Esse resultado corrobora com outros estudos da literatura que demonstram que o fluxo laminar gerado por biorreatores de perfusão favorecem o transporte de massa pelos biomateriais (118, 120). O uso do biorreator de perfusão, portanto, otimiza o metabolismo energético das CPEs cultivadas em biomateriais.

Com base nos resultados obtidos, é possível afirmar que os biomateriais de PCL funcionalizados com heparina e com VEGF são candidatos bastante promissores para uso como substitutos vasculares, em quadros graves de doenças arteriais periféricas. Ainda, o estudo demonstrou que o uso de biorreatores pode promover o crescimento mais rápido de células progenitoras endoteliais na parede luminal desses biomateriais, contribuindo para a sua rápida endotelização.

Apesar dos resultados bastante positivos encontrados para os biomateriais de PCL/Hep/VEGF, outros substitutos vasculares devem ser desenvolvidos a fim de atender a grande necessidade médica por enxertos que possam ser empregados adequadamente, principalmente, em vasos de pequeno diâmetro. Com base nisso, este grupo de pesquisa buscou desenvolver e avaliar um segundo tipo de biomaterial vascular. No capítulo III, biomateriais produzidos a partir de copolímeros de carbonato de trimetileno e ácido láctico foram investigados quanto a sua aplicação vascular.

Os copolímeros de carbonato de trimetileno são caracterizados por apresentarem uma elevada elasticidade, sendo chamados elastômeros ou “materiais tipo-borracha” (12). Esses polímeros apresentam a capacidade de se deformar mediante uma tensão mecânica e retornar, completamente e rapidamente, à sua forma original após a retirada do estímulo (67). Os copolímeros constituídos por carbonato de trimetileno e ácido láctico apresentam propriedades combinadas dos dois monômeros. Já foi demonstrado que o copolímero PTMCLLA apresenta alta elasticidade, devido à presença dos meros de TMC, e resistência à ruptura, fornecida pelos meros de ácido láctico (13, 70). Em função dessa característica, biomateriais produzidos a partir de copolímero de PTMCLLA têm sido pesquisados para o desenvolvimento de substitutos vasculares.

No capítulo III, biomateriais foram fabricados por *electrospinning* a partir de três copolímeros de PTMCLLA. Tais copolímeros apresentavam diferentes razões de TMC e ácido láctico em sua cadeia: 20/80, 30/70 e 40/60. Todos os biomateriais produzidos apresentaram morfologia semelhante, sendo constituídos por fibras lisas e uniformemente

distribuídas em sua estrutura (Capítulo III, Figura 1). Os biomateriais de PTMCLLA 30/70 apresentaram um diâmetro de fibra menor do que os demais. O diâmetro e a morfologia das fibras produzidas por *electrospinning* é um resultado da combinação das propriedades da solução polimérica e dos parâmetros utilizados para a execução da técnica (45). A concentração da solução apresenta uma relação direta com o diâmetro das fibras produzidas (124). As soluções poliméricas mais concentradas apresentam alta viscosidade. Essa propriedade faz com que a solução não sofra um grande estiramento durante o processo de *electrospinning*, originando fibras mais grossas (43). Ainda, o tipo de solvente utilizado para solubilização do polímero afeta a condutividade da solução final, o que altera a sua eletrofiação (43). Acredita-se que esses fatores tenham ocasionado a diferença de diâmetro encontrada entre as fibras de PTMCLLA 30/70 e as demais. Mesmo com fibras mais finas, esses biomateriais não apresentaram comprometimento de suas propriedades mecânicas ou degradabilidade aumentada (Capítulo III, Figuras 2 e 3).

A análise de degradação demonstrou que os biomateriais fabricados a partir de PTMCLLA apresentaram grande redução do peso molecular polimérico ao longo de 60 dias de análise (Capítulo III, Figura 2). As ligações ésteres, presentes nos resíduos de ácido lático, são mais suscetíveis à hidrólise do que as ligações de carbonato, existentes nos resíduos de TMC. Dessa forma, polímeros com maiores taxas de TMC devem apresentar maior resistência à degradação do que aqueles constituídos por maiores quantidades de ácido lático. Contudo, esse não foi o perfil observado no presente trabalho. Os biomateriais de PTMCLLA 20/80 e 30/70 apresentaram menor degradabilidade *in vitro* do que os biomateriais de PTMCLLA 40/60 (Capítulo III, Figura 2). Esse perfil foi atribuído ao fato do copolímero PTMCLLA 40/60 ter um peso molecular bastante inferior aos outros dois (Capítulo III, Tabela 2). Assim, essas cadeias poliméricas acabam sendo mais suscetíveis ao processo de hidrólise (125).

Como descrito anteriormente, os biomateriais utilizados como substitutos vasculares devem permanecer por um maior período no local do implante para que as células consigam se organizar e restaurar e/ou construir o tecido. Assim, esses biomateriais devem fornecer uma estrutura íntegra até que o tecido vascular seja completamente organizado, um processo que pode se estender por mais de 40 semanas (126). Os biomateriais de PTMCLLA apresentam degradação por erosão, isto é, eles apresentam perda de sua superfície proporcionalmente à redução de sua massa e dimensões. Esse perfil é muito importante para a medicina regenerativa, já que, esses

biomateriais mantêm sua integridade e propriedades mecânicas por um longo período de tempo (67). Contudo, os três biomateriais de PTMCLLA produzidos no trabalho exposto no capítulo III apresentaram uma redução do peso polimérico considerada elevada para a aplicação vascular. Essa característica poderia ser melhorada através da reticulação dos copolímeros. A formação de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas torna o polímero mais resistente à hidrólise e, ainda, pode otimizar suas propriedades mecânicas (13, 68).

A análise dinâmico-mecânica demonstrou que a resistência e a elasticidade dos biomateriais de PTMCLLA são dependentes da proporção entre TMC e ácido láctico no copolímero (Capítulo III, Figura 3). Os biomateriais de PTMCLLA 20/80 apresentaram um perfil mecânico semelhante ao dos poliésteres (97). Eles tiveram uma grande resistência à fratura; contudo, apresentaram uma baixa flexibilidade. Enquanto isso, os biomateriais de PTMCLLA 30/70 e 40/60 apresentaram uma menor resistência à fratura e uma alta flexibilidade, perfil semelhante ao dos elastômeros (12, 127). A elasticidade é uma característica essencial para um enxerto vascular, já que ele deve ter a capacidade de resistir aos estresses hemodinâmicos presentes *in situ* (29). Apesar de serem menos resistentes do que o PTMCLLA 20/80, os biomateriais fabricados com PTMCLLA 30/70 e 40/60 exibiram uma resistência semelhante a dos vasos naturais, que apresentam valor médio de tensão à fratura de 1.55 ± 0.4 MPa (70). Portanto, esses dois biomateriais apresentaram-se mais adequados à aplicação como substitutos vasculares, em termos de propriedades mecânicas. Contudo, em função da alta elasticidade, os biomateriais de PTMCLLA 40/60 apresentaram uma grande taxa de enrugamento quando expostos ao meio líquido. Essa característica poderia ocasionar a falha clínica do implante, pois provocaria a redução de seu diâmetro inicial e, conseqüentemente, a oclusão de seu lúmen. Dessa forma, esse grupo foi removido dos ensaios biológicos.

Apesar de alguns grupos de pesquisa já terem examinado o PTMCLLA para a fabricação de substitutos vasculares (68, 70, 128), ainda existem poucos estudos na literatura avaliando as propriedades biológicas desses materiais. Assim, o presente trabalho buscou avaliar a interação dos biomateriais de PTMCLLA com CTMs, CPEs e células musculares lisas. Esses tipos celulares estão presentes na parede dos vasos naturais ou, então, podem se diferenciar nas células existentes em tal (73, 74, 81).

A adesão celular foi o primeiro ensaio biológico realizado devido a sua grande importância para o sucesso do biomaterial (123). Somente após a adesão, as células

conseguem se proliferar e organizar as proteínas da matriz extracelular para formação tecidual (105). A adesão celular é mediada pela adsorção de proteínas da matriz extracelular à superfície do biomaterial e pela ligação via receptores de integrina, presentes na membrana celular (129). Logo, esse processo é bastante afetado pela topografia e superfície química do biomaterial (130). Tanto os biomateriais de PTMCLLA 20/80 como os de PTMCLLA 30/70 conseguiram, de maneira semelhante, promover a adesão dos três tipos celulares (Figura 4, Capítulo III). Contudo, a placa de cultivo, utilizada como grupo controle, apresentou um maior número de células aderidas, para as três linhagens utilizadas. Esse resultado já foi observado por outros autores, como Stefani e colaboradores. Em seu trabalho, eles demonstraram que CTMs apresentaram uma maior adesão sobre placas de cultivo do que em biomateriais produzidos a partir de blendas de PCL e PTMCLLA (70). As placas de cultivo comerciais são tratadas quimicamente para promoverem a adaptação celular e representam, hoje, o padrão ouro para o cultivo de células (70, 114, 130).

Após a adesão, tanto as CTMs, como as CPEs foram capazes de se proliferar sobre os biomateriais de PTMCLLA (Figura 4 d, e; Capítulo III). Para essa análise, também não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos. Esse resultado sugere que a variação da razão TMC/ácido láctico não interfere na proliferação desses tipos celulares. O estudo de Dargaville e colaboradores corrobora com esse achado. Os autores demonstraram que a variação de 30 a 70% no conteúdo de TMC no copolímero PTMCLLA não acarreta diferença no crescimento de CTMs (13). Messias e coautores também não observaram variação no número de osteoblastos cultivados em biomateriais de PTMCLLA e biomateriais de PLLA, evidenciando que a presença de TMC nessas estruturas não afeta a proliferação celular (131). As células musculares lisas também não apresentaram diferença significativa em sua viabilidade, em função do conteúdo de TMC nos biomateriais (Capítulo III, Figura 4 f). Porém, os biomateriais não proporcionaram o aumento do número dessas células, ao longo do período de cultivo. Acredita-se que esse comportamento ocorreu pelo fato de as células musculares lisas já serem células adultas, isto é, diferenciadas. Sabe-se que células já diferenciadas apresentam um menor potencial de proliferação em comparação a células-tronco ou progenitoras (77).

Apesar do conteúdo de TMC no copolímero PTMCLLA não ter alterado a proliferação celular, ele afetou o processo de adaptação das CTMs e das células musculares lisas. Quando cultivadas sobre os biomateriais de PTMCLLA 30/70, essas

células exibiram um aumento da sua área superficial (Capítulo III, Figura 5). Os dois tipos celulares exibiram um citoesqueleto mais espalhado sobre a superfície dos biomateriais de PTMCLLA 30/70 do que sobre os biomateriais de PTMCLLA 20/80. Ji e colaboradores também encontraram resultados semelhantes quando avaliaram a adaptação de fibroblastos sobre filmes de PTMCLLA e de poli(L-ácido láctico) (PLLA) (132). Os autores mostraram que, sobre PLLA, os fibroblastos apresentam uma morfologia arredondada, pouco espalhada. Enquanto isso, sobre os filmes de PTMCLLA, os fibroblastos têm o seu citoesqueleto espalhado, demonstrando uma maior interação com o substrato. Essa diferença foi atribuída a maior flexibilidade dos filmes que continham TMC. Com base nessa avaliação, sugere-se que as CTMs e as células musculares lisas também conseguem melhor adaptar-se sobre superfícies mais flexíveis do que rígidas.

As CPEs não apresentaram grandes diferenças em sua morfologia quando cultivadas sobre os biomateriais de PTMCLLA 20/80 e 30/70. Essas células apresentaram-se arredondadas sobre as duas superfícies. Isso indica que as CPEs não conseguiram estabelecer uma grande interação com esses materiais. Como relatado anteriormente, esse tipo celular apresenta uma maior dependência do contato com proteínas da matriz extracelular para seu desenvolvimento (94, 133, 134). Diferente dos biomateriais de PCL/Hep/VEGF, apresentados no capítulo I, os biomateriais de PTMCLLA não apresentam nenhum domínio natural para o ancoramento celular. Acredita-se que esse fator tenha contribuído para a menor adaptação das CPEs nos biomateriais de PTMCLLA do que nos de PCL/Hep/VEGF. Uma alternativa para melhorar essa propriedade e promover a endotelização, seria também realizar a funcionalização da superfície do biomaterial de PTMCLLA 30/70. Assim, se teria um biomaterial extremamente flexível e com características biológicas mais adequadas à manutenção de células progenitoras endoteliais.

De acordo com as características apresentadas, biomateriais de PTMCLLA 30/70 apresentam propriedades físico-químicas compatíveis para a aplicação como substitutos vasculares. Ainda, suportam a adesão de células-tronco mesenquimais, células progenitoras endoteliais e células musculares lisas. Portanto, também são candidatos bastante interessantes para o uso na engenharia de tecidos vasculares.

6. Conclusões

Gerais:

- A funcionalização de biomateriais de PCL com heparina e VEGF previne a formação de trombos e favorece a proliferação e a adaptação de células progenitoras endoteliais sobre a sua superfície;
- O uso de biorreatores de parede rotatória e de perfusão favorece a endotelização do lúmen de biomateriais tubulares de PCL, funcionalizados com heparina e com VEGF;
- Os biomateriais produzidos a partir de PTMCLLA 30/70 apresentam propriedades físico-químicas e biológicas compatíveis com a aplicação na engenharia de tecidos vasculares.

Específicas

- Biomateriais fibrosos de PCL e de PTMCLLA foram produzidos adequadamente pela técnica de *electrospinning*;
- Os biomateriais de PCL apresentam taxa de degradação, propriedades mecânicas e morfologia adequadas à aplicação na engenharia de tecidos vasculares;
- A funcionalização dos biomateriais de PCL com heparina e VEGF previne a formação de trombos e favorece o crescimento de CTMs e de CPEs em relação aos biomateriais não funcionalizados;
- A expressão de VE-caderina é aumentada nas CPEs cultivadas sobre biomateriais de PCL;
- A quantidade de VEGF liberada pelos biomateriais de PCL funcionalizados com esse fator não é suficiente para promover a diferenciação de CTMs em células endoteliais. No entanto, o VEGF presente nos biomateriais mantém a expressão de CD34 e de CD31 nas CPEs;
- Os biomateriais produzidos com PTMCLLA nas razões 30/70 e 40/60 apresentam alta flexibilidade. Porém, os biomateriais de PTMCLLA 40/60 apresentam uma alta taxa de enrugamento quando colocados em contato com meio de cultivo, impossibilitando sua avaliação biológica e aplicabilidade clínica;

- Os biomateriais de PTMCLLA 30/70 e 20/80 suportaram a adesão e/ou crescimento de células-tronco mesenquimais, células progenitoras endoteliais e células musculares lisas. As células cultivadas sobre os biomateriais de PTMCLLA 30/70 exibiram um citoesqueleto mais espalhado, indicando uma melhor adaptação sobre esse copolímero;
- Os biorreatores de parede rotatória favorecem a semeadura uniforme de CPEs no lúmen de biomateriais de PCL funcionalizados com heparina e VEGF;
- Os biorreatores de perfusão promovem a proliferação de CPEs e propiciam seu alongamento na direção do fluxo do meio de cultura. Além disso, esses biorreatores otimizam a difusão de nutrientes e de oxigênio pelos biomateriais, favorecendo o metabolismo energético aeróbico das células.

Os resultados obtidos demonstram que biomateriais de PCL funcionalizados com heparina e VEGF e biomateriais de PTMCLLA 30/70 são interessantes candidatos para aplicação como substitutos vasculares em quadros graves de doença arterial periférica. Ainda, que a endotelização de biomateriais vasculares pode ser otimizada através do uso de biorreatores de parede rotatória e de perfusão.

7. Perspectivas

- I. Promover a formação da camada muscular nos biomateriais de PCL funcionalizados com heparina e VEGF;
- II. Realizar o co-cultivo de células progenitoras endoteliais e de células musculares lisas nos biomateriais de PCL funcionalizados com heparina e com VEGF;
- III. Avaliar os biomateriais de PCL funcionalizados com heparina e VEGF em modelo animal de doença arterial periférica;
- IV. Construir biomateriais de PTMCLLA 30/70 em formato tubular e associá-los a células progenitoras endoteliais e células musculares lisas através do uso de biorreatores.

8. Referências bibliográficas

1. Tu C, Das S, Baker AB, Zoldan J, Suggs LJ. Nanoscale strategies: treatment for peripheral vascular disease and critical limb ischemia. *ACS Nano*. 2015;9(4):3436-52.
2. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft-Past, Present, and Future. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015.
3. Ikada Y. Challenges in tissue engineering. *J R Soc Interface*. 2006;3(10):589-601.
4. Tesfamariam B. Endothelial Repair and Regeneration Following Intimal Injury. *J Cardiovasc Transl Res*. 2016;9(2):91-101.
5. Doan CC, Le TL, Hoang NS, Doan NT, Le VD, Do MS. Differentiation of umbilical cord lining membrane-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. *Iran Biomed J*. 2014;18(2):67-75.
6. Abe Y, Ozaki Y, Kasuya J, Yamamoto K, Ando J, Sudo R, et al. Endothelial progenitor cells promote directional three-dimensional endothelial network formation by secreting vascular endothelial growth factor. *PLoS One*. 2013;8(12):e82085.
7. Braghirolli DI, Steffens D, Pranke P. Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics. *Drug Discov Today*. 2014;19(6):743-53.
8. Tillman BW, Yazdani SK, Lee SJ, Geary RL, Atala A, Yoo JJ. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. *Biomaterials*. 2009;30(4):583-8.
9. Pranke P, Weibel DE, Braghirolli DI. Electrospun Scaffolds of Biodegradable Polyesters: Manufacturing and Biomedical Application. In: Fakirov S, editor. *Biodegradable Polyesters*. 1: Wiley VCH; 2015. p. 155-80.
10. Ye L, Wu X, Mu Q, Chen B, Duan Y, Geng X, et al. Heparin-Conjugated PCL Scaffolds Fabricated by Electrospinning and Loaded with Fibroblast Growth Factor 2. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2011;22(1-3):389-406.
11. Anderson EM, Kwee BJ, Lewin SA, Raimondo T, Mehta M, Mooney DJ. Local delivery of VEGF and SDF enhances endothelial progenitor cell recruitment and resultant recovery from ischemia. *Tissue Eng Part A*. 2015;21(7-8):1217-27.
12. Bao M, Lou X, Zhou Q, Dong W, Yuan H, Zhang Y. Electrospun biomimetic fibrous scaffold from shape memory polymer of PDLLA-co-TMC for bone tissue engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014;6(4):2611-21.
13. Dargaville BL, Vaquette C, Peng H, Rasoul F, Chau YQ, Cooper-White JJ, et al. Cross-linked poly(trimethylene carbonate-co-L-lactide) as a biodegradable, elastomeric scaffold for vascular engineering applications. *Biomacromolecules*. 2011;12(11):3856-69.
14. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2004;22(2):80-6.
15. Arrigoni C, Chittò A, Mantero S, Remuzzi A. Rotating versus perfusion bioreactor for the culture of engineered vascular constructs based on hyaluronic acid. *Biotechnol Bioeng*. 2008;100(5):988-97.
16. Patel MR, Conte MS, Cutlip DE, Dib N, Geraghty P, Gray W, et al. Evaluation and treatment of patients with lower extremity peripheral artery disease: consensus definitions from Peripheral Academic Research Consortium (PARC). *J Am Coll Cardiol*. 2015;65(9):931-41.

17. Stoner MC, Calligaro KD, Chaer RA, Dietzek AM, Farber A, Guzman RJ, et al. Reporting standards of the Society for Vascular Surgery for endovascular treatment of chronic lower extremity peripheral artery disease. *J Vasc Surg.* 2016;64(1):e1-e21.
18. (UK) RCoP. Lower Limb Peripheral Arterial Disease: Diagnosis and Management London: *National Clinical Guideline Centre at*; 2012. p. 1-299.
19. National Institute for Health and Clinical Excellence N. Lower limb peripheral arterial disease: diagnosis and management. UK: NICE Clinical Guideline 147; 2012.
20. Lim GB. Vascular disease: Peripheral artery disease pandemic. *Nat Rev Cardiol.* 2013;10(10):552-3.
21. Fowkes FG, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet.* 2013;382(9901):1329-40.
22. Shamoun FE, Fankhauser GT, Mookadam M. Vascular medicine: aortic and peripheral arterial disease. *Prim Care.* 2013;40(1):169-77.
23. Zeller T, Rastan A, Macharzina R, Beschoner U, Noory E. Novel Approaches to the Management of Advanced Peripheral Artery Disease: Perspectives on Drug-Coated Balloons, Drug-Eluting Stents, and Bioresorbable Scaffolds. *Curr Cardiol Rep.* 2015;17(9):624.
24. Malgor RD, Alahdab F, Alalahdab F, Elraiyyah TA, Rizvi AZ, Lane MA, et al. A systematic review of treatment of intermittent claudication in the lower extremities. *J Vasc Surg.* 2015;61(3 Suppl):54S-73S.
25. Suzuki J, Shimamura M, Suda H, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, et al. Current therapies and investigational drugs for peripheral arterial disease. *Hypertens Res.* 2016;39(4):183-91.
26. Tresoldi C, Pellegata AF, Mantero S. Cells and stimuli in small-caliber blood vessel tissue engineering. *Regen Med.* 2015;10(4):505-27.
27. Vara DS, Salacinski HJ, Kannan RY, Bordenave L, Hamilton G, Seifalian AM. Cardiovascular tissue engineering: state of the art. *Pathol Biol (Paris).* 2005;53(10):599-612.
28. Benrashid E, McCoy CC, Youngwirth LM, Kim J, Manson RJ, Otto JC, et al. Tissue engineered vascular grafts: Origins, development, and current strategies for clinical application. *Methods.* 2016;99:13-9.
29. Isenberg BC, Williams C, Tranquillo RT. Small-diameter artificial arteries engineered in vitro. *Circ Res.* 2006;98(1):25-35.
30. Tan Z, Wang H, Gao X, Liu T, Tan Y. Composite vascular grafts with high cell infiltration by co-electrospinning. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016;67:369-77.
31. He W, Hu Z, Xu A, Liu R, Yin H, Wang J, et al. The Preparation and Performance of a New Polyurethane Vascular Prosthesis. *Cell Biochem Biophys.* 2013.
32. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-6.
33. Dutta RC, Dey M, Dutta AK, Basu B. Competent processing techniques for scaffolds in tissue engineering. *Biotechnol Adv.* 2017.
34. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *Eur Cell Mater.* 2013;26:120-32.
35. Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2480-7.
36. Best C, Onwuka E, Pepper V, Sams M, Breuer J, Breuer C. Cardiovascular Tissue Engineering: Preclinical Validation to Bedside Application. *Physiology (Bethesda).* 2016;31(1):7-15.

37. Ju YM, Choi JS, Atala A, Yoo JJ, Lee SJ. Bilayered scaffold for engineering cellularized blood vessels. *Biomaterials*. 2010;31(15):4313-21.
38. Truskey GA. Advancing cardiovascular tissue engineering. *F1000Res*. 2016;5.
39. Gilbert Triplett R, Budinskaya O. New Frontiers in Biomaterials. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2017;29(1):105-15.
40. Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med*. 2001;52:443-51.
41. Fukunishi T, Best CA, Sugiura T, Shoji T, Yi T, Udelsman B, et al. Tissue-Engineered Small Diameter Arterial Vascular Grafts from Cell-Free Nanofiber PCL/Chitosan Scaffolds in a Sheep Model. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158555.
42. Li Y, Li X, Zhao R, Wang C, Qiu F, Sun B, et al. Enhanced adhesion and proliferation of human umbilical vein endothelial cells on conductive PANI-PCL fiber scaffold by electrical stimulation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;72:106-12.
43. Li D, Xia Y. Electrospinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel? *Advanced Materials*. 2004;16(14): 1151–70.
44. Eatemadi A, Daraee H, Zarghami N, Melat Yar H, Akbarzadeh A. Nanofiber: Synthesis and biomedical applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016;44(1):111-21.
45. Boudriot U, Dersch R, Greiner A, Wendorff JH. Electrospinning approaches toward scaffold engineering--a brief overview. *Artif Organs*. 2006;30(10):785-92.
46. Ercolani E, Del Gaudio C, Bianco A. Vascular tissue engineering of small-diameter blood vessels: reviewing the electrospinning approach. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015;9(8):861-88.
47. Liang D, Hsiao BS, Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(14):1392-412.
48. Bhardwaj N, Kundu SC. Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnol Adv*. 2010;28(3):325-47.
49. Zhang M, Wang K, Wang Z, Xing B, Zhao Q, Kong D. Small-diameter tissue engineered vascular graft made of electrospun PCL/lecithin blend. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(11):2639-48.
50. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 2007;32:762-98.
51. Ahn H, Ju YM, Takahashi H, Williams DF, Yoo JJ, Lee SJ, et al. Engineered small diameter vascular grafts by combining cell sheet engineering and electrospinning technology. *Acta Biomater*. 2015;16:14-22.
52. Drilling S, Gaumer J, Lannutti J. Fabrication of burst pressure competent vascular grafts via electrospinning: effects of microstructure. *J Biomed Mater Res A*. 2009;88(4):923-34.
53. Hong JK, Bang JY, Xu G, Lee JH, Kim YJ, Lee HJ, et al. Thickness-controllable electrospun fibers promote tubular structure formation by endothelial progenitor cells. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1189-200.
54. Soliman S, Sant S, Nichol JW, Khabiry M, Traversa E, Khademhosseini A. Controlling the porosity of fibrous scaffolds by modulating the fiber diameter and packing density. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96(3):566-74.
55. Kai D, Jin G, Prabhakaran MP, Ramakrishna S. Electrospun synthetic and natural nanofibers for regenerative medicine and stem cells. *Biotechnol J*. 2013;8(1):59-72.
56. Dandan-Hital R, Brunton LL. *Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman*. 2 ed. Porto Alegre 2015.

57. Tao Y, Hu T, Wu Z, Tang H, Hu Y, Tan Q, et al. Heparin nanomodification improves biocompatibility and biomechanical stability of decellularized vascular scaffolds. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:5847-58.
58. Ye L, Wu X, Duan H-Y, Geng X, Chen B, Gu Y-Q, et al. The in vitro and in vivo biocompatibility evaluation of heparin–poly(ε-caprolactone) conjugate for vascular tissue engineering scaffolds *Journal of biomedical materials research A* [Internet]. 2012; 100A:[3251–8 pp.].
59. Su Y, Li X, Liu Y, Su Q, Qiang ML, Mo X. Encapsulation and Controlled Release of Heparin from Electrospun Poly(L-Lactide-co-ε-Caprolactone) Nanofibers. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2011;22(1-3):165-77.
60. Singh S, Wu BM, Dunn JC. The enhancement of VEGF-mediated angiogenesis by polycaprolactone scaffolds with surface cross-linked heparin. *Biomaterials*. 2011;32(8):2059-69.
61. Du F, Wang H, Zhao W, Li D, Kong D, Yang J, et al. Gradient nanofibrous chitosan/poly ε-caprolactone scaffolds as extracellular microenvironments for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2012;33(3):762-70.
62. Quint C, Kondo Y, Manson RJ, Lawson JH, Dardik A, Niklason LE. Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(22):9214-9.
63. Nieves BJ, D'Amore PA, Bryan BA. The function of vascular endothelial growth factor. *Biofactors*. 2009;35(4):332-7.
64. Crafts TD, Jensen AR, Blocher-Smith EC, Markel TA. Vascular endothelial growth factor: therapeutic possibilities and challenges for the treatment of ischemia. *Cytokine*. 2015;71(2):385-93.
65. Stefanini MO, Wu FT, Mac Gabhann F, Popel AS. The presence of VEGF receptors on the luminal surface of endothelial cells affects VEGF distribution and VEGF signaling. *PLoS Comput Biol*. 2009;5(12):e1000622.
66. Singh S, Wu BM, Dunn JC. Accelerating vascularization in polycaprolactone scaffolds by endothelial progenitor cells. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(13-14):1819-30.
67. Bat E, Zhang Z, Feijen J, Grijpma DW, Poot AA. Biodegradable elastomers for biomedical applications and regenerative medicine. *Regen Med*. 2014;9(3):385-98.
68. Dargaville BL, Vaquette C, Rasoul F, Cooper-White JJ, Campbell JH, Whittaker AK. Electrospinning and crosslinking of low-molecular-weight poly(trimethylene carbonate-co-(L)-lactide) as an elastomeric scaffold for vascular engineering. *Acta Biomater*. 2013;9(6):6885-97.
69. Yang J, Liu F, Tu S, Chen Y, Luo X, Lu Z, et al. Haemo- and cytocompatibility of bioresorbable homo- and copolymers prepared from 1,3-trimethylene carbonate, lactides, and epsilon-caprolactone. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(2):396-407.
70. Stefani I, Cooper-White JJ. Development of an in-process UV-crosslinked, electrospun PCL/aPLA-co-TMC composite polymer for tubular tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2016;36:231-40.
71. Mukherjee DP, Smith DF, Rogers SH, Emmanuel JE, Jadin KD, Hayes BK. Effect of 3D-microstructure of bioabsorbable PGA:TMC scaffolds on the growth of chondrogenic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009;88(1):92-102.
72. Aires MdM. *Fisiologia*. 4 ed. Rio de Janeiro 2013.
73. Stegemann JP, Kaszuba SN, Rowe SL. Review: advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials. *Tissue Eng*. 2007;13(11):2601-13.

74. Melchiorri AJ, Hibino N, Fisher JP. Strategies and techniques to enhance the in situ endothelialization of small-diameter biodegradable polymeric vascular grafts. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19(4):292-307.
75. Volz KS, Miljan E, Khoo A, Cooke JP. Development of pluripotent stem cells for vascular therapy. *Vascul Pharmacol.* 2012;56(5-6):288-96.
76. Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res.* 2005;124(2):201-8.
77. Rammal H, Harmouch C, Lataillade JJ, Laurent-Maquin D, Labrude P, Menu P, et al. Stem cells: a promising source for vascular regenerative medicine. *Stem Cells Dev.* 2014;23(24):2931-49.
78. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 11):2204-13.
79. Fossett E, Khan WS. Optimising human mesenchymal stem cell numbers for clinical application: a literature review. *Stem Cells Int.* 2012;2012:465259.
80. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
81. Wingate K, Floren M, Tan Y, Tseng PO, Tan W. Synergism of matrix stiffness and vascular endothelial growth factor on mesenchymal stem cells for vascular endothelial regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(17-18):2503-12.
82. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):341-7.
83. Huang NF, Li S. Mesenchymal stem cells for vascular regeneration. *Regen Med.* 2008;3(6):877-92.
84. Werle SB, Lindemann D, Steffens D, Demarco FF, de Araujo FB, Pranke P, et al. Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clin Oral Investig.* 2016;20(1):75-81.
85. Bernardi L, Luisi SB, Fernandes R, Dalberto TP, Valentim L, Bogo Chies JA, et al. The isolation of stem cells from human deciduous teeth pulp is related to the physiological process of resorption. *J Endod.* 2011;37(7):973-9.
86. Xavier Acasigua GA, Bernardi L, Braghirolli DI, Filho MS, Pranke P, Medeiros Fossati AC. Nanofiber scaffolds support bone regeneration associated with pulp stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014;9(4):330-7.
87. Glynn JJ, Hinds MT. Endothelial outgrowth cells: function and performance in vascular grafts. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(4):294-303.
88. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275(5302):964-7.
89. Balaji S, King A, Crombleholme TM, Keswani SG. The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2(6):283-95.
90. Smadja DM, Cornet A, Emmerich J, Aiach M, Gaussem P. Endothelial progenitor cells: characterization, in vitro expansion, and prospects for autologous cell therapy. *Cell Biol Toxicol.* 2007;23(4):223-39.
91. Guan XM, Cheng M, Li H, Cui XD, Li X, Wang YL, et al. Biological properties of bone marrow-derived early and late endothelial progenitor cells in different culture media. *Mol Med Rep.* 2013;8(6):1722-8.

92. Cheng CC, Chang SJ, Chueh YN, Huang TS, Huang PH, Cheng SM, et al. Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses. *BMC Genomics*. 2013;14:182.
93. Tagawa S, Nakanishi C, Mori M, Yoshimuta T, Yoshida S, Shimojima M, et al. Determination of Early and Late Endothelial Progenitor Cells in Peripheral Circulation and Their Clinical Association with Coronary Artery Disease. *Int J Vasc Med*. 2015;2015:674213.
94. Colombo E, Calcaterra F, Cappelletti M, Mavilio D, Della Bella S. Comparison of Fibronectin and Collagen in Supporting the Isolation and Expansion of Endothelial Progenitor Cells from Human Adult Peripheral Blood. *PLoS One*. 2013;8(6):e66734.
95. Guerrero J, Catros S, Derkaoui SM, Lalande C, Siadous R, Bareille R, et al. Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater*. 2013;9(9):8200-13.
96. Steffens D, Mathor MB, Santi BT, Luco DP, Pranke P. Development of a biomaterial associated with mesenchymal stem cells and keratinocytes for use as a skin substitute. *Regen Med*. 2015;10(8):975-87.
97. Braghirolli DI, Zamboni F, Acasigua GA, Pranke P. Association of electrospinning with electrospraying: a strategy to produce 3D scaffolds with incorporated stem cells for use in tissue engineering. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:5159-69.
98. Jung Y, Ji H, Chen Z, Fai Chan H, Atchison L, Klitzman B, et al. Scaffold-free, Human Mesenchymal Stem Cell-Based Tissue Engineered Blood Vessels. *Sci Rep*. 2015;5:15116.
99. Uzarski JS, Cores J, McFetridge PS. Physiologically Modeled Pulse Dynamics to Improve Function in In Vitro-Endothelialized Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(11):1125-34.
100. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, et al. Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* (1985). 2003;95(5):2081-8.
101. Ankeny RF, Ankeny CJ, Nerem RM, Jo H. Maturing EPCs into endothelial cells: may the force be with the EPCs: focus on "Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303(6):C589-91.
102. Melchiorri AJ, Bracaglia LG, Kimerer L, Hibino N, Fisher JP. In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods*. 2016.
103. Obi S, Masuda H, Shizuno T, Sato A, Yamamoto K, Ando J, et al. Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;303(6):C595-606.
104. He W, Hu Z, Xu A, Liu R, Yin H, Wang J, et al. The preparation and performance of a new polyurethane vascular prosthesis. *Cell Biochem Biophys*. 2013;66(3):855-66.
105. Rosa ARd. Electrospinning de emulsão para a produção de matrizes de nanofibras como estratégia para cultivo de células-tronco e incorporação de fatores de crescimento. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
106. M N, C A, M C-H, MP G, E E, JA P. Development of a Biodegradable Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering: Physicochemical, Topographical, Mechanical, Degradation, and Biological Properties 2006. p. 209–31.

- 107.Sasaki N, Okishio K, Ui-Tei K, Saigo K, Kinoshita-Toyoda A, Toyoda H, et al. Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2008;283(6):3594-606.
- 108.Furue MK, Na J, Jackson JP, Okamoto T, Jones M, Baker D, et al. Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(36):13409-14.
- 109.Ling L, Camilleri ET, Helledie T, Samsonraj RM, Titmarsh DM, Chua RJ, et al. Effect of heparin on the biological properties and molecular signature of human mesenchymal stem cells. *Gene*. 2016;576(1 Pt 2):292-303.
- 110.Ye X, Wang H, Zhou J, Li H, Liu J, Wang Z, et al. The effect of Heparin-VEGF multilayer on the biocompatibility of decellularized aortic valve with platelet and endothelial progenitor cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e54622.
- 111.Nelson DLMC, Michael. *Princípios de Bioquímica de Lehninger* 2014.
- 112.Teran M, Nugent MA. Synergistic Binding of Vascular Endothelial Growth Factor-A and Its Receptors to Heparin Selectively Modulates Complex Affinity. *J Biol Chem*. 2015;290(26):16451-62.
- 113.Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr*. 2014;8(2):158-64.
- 114.Stefani I, Asnaghi MA, Cooper-White JJ, Mantero S. A double chamber rotating bioreactor for enhanced tubular tissue generation from human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016.
- 115.Ghezzi CE, Risse PA, Marelli B, Muja N, Barralet JE, Martin JG, et al. An airway smooth muscle cell niche under physiological pulsatile flow culture using a tubular dense collagen construct. *Biomaterials*. 2013;34(8):1954-66.
- 116.Ciechanowska A, Ladyzynski P, Hoser G, Sabalinska S, Kawiak J, Foltynski P, et al. Human endothelial cells hollow fiber membrane bioreactor as a model of the blood vessel for in vitro studies. *J Artif Organs*. 2016;19(3):270-7.
- 117.Santos DSd. Avaliação da influência do tempo de incubação na adesão das células-tronco mesenquimais quando cultivadas em matrizes de nanofibras. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2012.
- 118.Zhang X, Wang X, Keshav V, Johanas JT, Leisk GG, Kaplan DL. Dynamic culture conditions to generate silk-based tissue-engineered vascular grafts. *Biomaterials*. 2009;30(19):3213-23.
- 119.Buttafoco L, Boks NP, Engbers-Buijtenhuijs P, Grijpma DW, Poot AA, Dijkstra PJ, et al. Porous hybrid structures based on P(DLLA-co-TMC) and collagen for tissue engineering of small-diameter blood vessels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2006;79(2):425-34.
- 120.Engbers-Buijtenhuijs P, Buttafoco L, Poot AA, Dijkstra PJ, de Vos RA, Sterk LM, et al. Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor. *Biomaterials*. 2006;27(11):2390-7.
- 121.Amaya R, Pierides A, Tarbell JM. The Interaction between Fluid Wall Shear Stress and Solid Circumferential Strain Affects Endothelial Gene Expression. *PLoS One*. 2015;10(7):e0129952.
- 122.Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics*. 2002;9(1):27-41.
- 123.Braghirolli DI, Steffens D, Quintiliano K, Acasigua GA, Gamba D, Fleck RA, et al. The effect of sterilization methods on electrospun poly(lactide-co-glycolide) and subsequent adhesion efficiency of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102(4):700-8.

124. Baji A, Yiu-Wing, Wong S-C, Abtahi M, Chen P. Electrospinning of polymer nanofibers: Effects on oriented morphology, structures and tensile properties. *Composites Science and Technology*. 2010;70:703-18.
125. Pêgo AP, Poot AA, Grijpma DW, Feijen J. Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. *J Control Release*. 2003;87(1-3):69-79.
126. McBane JE, Sharifpoor S, Labow RS, Ruel M, Suuronen EJ, Santerre JP. Tissue engineering a small diameter vessel substitute: engineering constructs with select biomaterials and cells. *Curr Vasc Pharmacol*. 2012;10(3):347-60.
127. Pêgo AP, Poot AA, Grijpma DW, Feijen J. Physical properties of high molecular weight 1,3-trimethylene carbonate and D,L-lactide copolymers. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14(9):767-73.
128. Hiob MA, Crouch GW, Weiss AS. Elastomers in vascular tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;40:149-54.
129. Andrews KD, Hunt JA, Black RA. Effects of sterilisation method on surface topography and in-vitro cell behaviour of electrostatically spun scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(6):1014-26.
130. Steffens D, Lersch M, Rosa A, Scher C, Crestani T, Morais MG, et al. A new biomaterial of nanofibers with the microalga *Spirulina* as scaffolds to cultivate with stem cells for use in tissue engineering. *J Biomed Nanotechnol*. 2013;9(4):710-8.
131. Messias AD, Martins KF, Motta AC, Duek EA. Synthesis, Characterization, and Osteoblastic Cell Culture of Poly(L-co-D,L-lactide-co-trimethylene carbonate) Scaffolds. *International Journal of Biomaterials*. 2014;2014:501789.
132. Ji LJ, Lai KL, He B, Wang G, Song LQ, Wu Y, et al. Study on poly(L-lactide-co-trimethylene carbonate): synthesis and cell compatibility of electrospun film. *Biomed Mater*. 2010;5(4):045009.
133. Bueno-Betí C, Novella S, Lázaro-Franco M, Pérez-Cremades D, Heras M, Sanchís J, et al. An affordable method to obtain cultured endothelial cells from peripheral blood. *J Cell Mol Med*. 2013;17(11):1475-83.
134. Geti I, Ormiston ML, Rouhani F, Toshner M, Movassagh M, Nichols J, et al. A practical and efficient cellular substrate for the generation of induced pluripotent stem cells from adults: blood-derived endothelial progenitor cells. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(12):855-65.

Outras publicações realizadas durante o período de doutorado

Drug Discovery Today • Volume 00, Number 00 • April 2014

REVIEWS



Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics

Daikelly I. Braghirolli^{1,2,4}, Daniela Steffens^{1,2,4} and Patricia Pranke^{1,2,3}

¹Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90610-000, Brazil

²Post Graduate Program in Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90010-170, Brazil

³Stem Cell Research Institute, Porto Alegre 90020-010, Brazil

Electrospun fibers are promising tissue engineering scaffolds that offer the cells an environment that mimics the native extracellular matrix. Fibers with different characteristics can be produced by the electrospinning technique according to the needs of the tissue to be repaired. In this review, the process of electrospinning was examined, providing a description of the common techniques used for the physicochemical and biological characterization of electrospun fibers. The review also discusses the potential applications of electrospun scaffolds for tissue engineering, based on scientific literature.

Introduction

Failure of organ and/or tissue function as a result of injury, disease or aging has a high impact on quality of life and also incurs a large social and economic cost. Current treatments vary with the organ affected, but all of them have their limitations [1]. Frequently, organ transplantation is the indicated therapy for these clinical cases; however, there are several disadvantages in using autologous or allogenic grafts, including shortage of appropriate donor organs, risk of disease transmission and immune rejection [2]. Tissue engineering (TE) is an exciting area that involves engineering and biological knowledge to create or restore tissue and organs. It utilizes three basic tools: cells, biomaterials and biomolecules. Electrospinning (ES) is a simple and versatile technique that produces scaffolds formed by nano- and micro-fibers, which offer a favorable micro-environment for cellular development by mimicking the native extracellular matrix [3]. The aim of this review paper is to describe the production of electrospun scaffolds and examine the most commonly used techniques for their physicochemical and biological characterizations. It also discusses the main biomedical applications of electrospun fibers and the cell sources used in TE.

The electrospinning process

From the techniques used to construct biomaterials to be cultivated with cells, ES is the most widely studied and it has also been

demonstrated as giving the most promising results in terms of TE applications. The first recorded citation detailing the application of high electrical potentials to generate aerosols from drops of fluids was in 1745; but not until 1929 was the application of an electrical field to produce artificial silk described. Until the 1990s, there was no commercial interest in this technique, although advances and patents in the field were achieved [4]. A search in February 2014 for the keyword 'electrospinning' in PubMed showed an increased interest for this technique after 2000.

The electrospinning process works by the electrostatic principle. As can be seen in Fig. 1, the machine is basically composed of a syringe with a nozzle, a counter electrode (normally a metal plate), a source of electrical field and a pump. The solution to be electrospun is applied to the system via the nozzle of the syringe and is pulsed by the pump. It is then subjected to a difference in an electrical voltage present between the nozzle and the counter electrode. This electrical voltage generated by the source causes a cone-shaped deformation of the drop of polymer solution. The solvent in the solution evaporates on its way to the counter electrode and, at the end of the process, solid continuous filaments are yielded [5]. It is important to note that the gravitational forces do not interfere in the process because the acceleration of the fiber formation is up to 600 m/s², which is close to two orders of magnitude greater than the acceleration of gravitational forces. Because of this, it is possible to form fibers from top-down, bottom-up or other types of arrangements [6].

Corresponding author: Pranke, P. (patriciapranke@ufrgs.br)

⁴These authors contributed equally to this paper.

1359-6446/06/\$ - see front matter © 2014 Published by Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.024>

www.drugdiscoverytoday.com

Please cite this article in press as: Braghirolli, D.I. et al., Electrospinning for regenerative medicine: a review of the main topics, Drug Discov Today (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.024>

Novel Chemically Modified Bacterial Cellulose Nanocomposite as Potential Biomaterial for Stem Cell Therapy Applications

Gerson Arisoly Xavier Acasigua¹, Gabriel Molina de Olyveira^{2,*}, Ligia Maria Manzine Costa³, Daikelly Iglesias Braghirolli^{4,5}, Anna Christina Medeiros Fossati¹, Antonio Carlos Guastaldi², Patricia Franke^{4,5,6}, Gildásio de Cerqueira Daltro⁷ and Pierre Basmaji⁸

¹Post-graduate Program in Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre-RS, 90610-000, Brazil; ²Department of Physical Chemistry- UNESP/Araraquara-SP, 14800-900, Brazil; ³Department of Nanoscience and Advanced Materials- UFABC/Santo André-SP, 09210-170, Brazil; ⁴Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul- UFRGS, Porto Alegre-RS, 90610-000, Brazil.; ⁵Post-graduate Program in Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre-RS, 90610-000, Brazil; ⁶Stem Cell Research Institute (SCRI), Porto Alegre-RS, 90610-000, Brazil; ⁷College Hospital Complex Prof. Edgard Santos (COM-HUPES); UFBA, Salvador, 40110-910, Brazil; ⁸Innovatec's - Biotechnology Research and Development, São Carlos-SP, 13560-042, Brazil

Abstract: Bacterial cellulose (BC) has become established as a remarkably versatile biomaterial and can be used in a wide variety of applied scientific applications, especially for medical devices. In this work, the bacterial cellulose fermentation process is modified by the addition of hyaluronic acid and gelatin (1% w/w) to the culture medium before the bacteria is inoculated. Hyaluronic acid and gelatin influence in bacterial cellulose was analyzed using Transmission Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Adhesion and viability studies with human dental pulp stem cells using natural bacterial cellulose/hyaluronic acid as scaffolds for regenerative medicine are presented for the first time in this work. MTT viability assays show higher cell adhesion in bacterial cellulose/gelatin and bacterial cellulose/hyaluronic acid scaffolds over time with differences due to fiber agglomeration in bacterial cellulose/gelatin. Confocal microscopy images showed that the cell were adhered and well distributed within the fibers in both types of scaffolds.

Keywords: Bacterial cellulose, cell viability study, Nanoskin[®], natural nanocomposites, regenerative medicine, stem cells.

1. INTRODUCTION

Gluconacetobacter xylinus (bacterial cellulose, BC) is an emerging biomaterial with great potential in several applications due its high purity, ultra-fine network structure and high mechanical properties in dry state [1]. These features allow its application as scaffolds for tissue regeneration, medical applications and nanocomposites. Some studies have used bacterial cellulose mats to reinforce polymeric matrices and scaffolds with wound healing properties. BC is a natural cellulose produced by bacterial synthesis by biochemical steps and self-assembling of the secreted cellulose fibrils on the medium. Shaping of BC materials in the culture medium can be controlled by the type of cultivation that changes chain size, origin of strains which produces different proportions of crystalline phase of BC and the kind of bioreactor. BC hydrogel or BC in dry state is then obtained by methods, such as freeze-drying [2]. Although chemically identical to plant cellulose, the cellulose synthesized by the bacteria has a fibrillar nanostructure, which determines its physical and mechanical properties, necessary characteristics for modern medicine and biomedical research [3]. The structural features of microbial cellulose, its properties and compatibility as a

biomaterial for regenerative medicine can be changed by modifying its culture medium [4] or surface modification by physical [5, 6]; chemical methods [7] and genetic modifications [8] to obtain a biomaterial with less rejection when in contact to the cell and cell interaction.

Different gelatin formulations have been studied to evaluate the drug loading capacity and release rate. Like other hydrogels, drug release profiles obtained from gelatin hydrogels can be readily adjusted by changing the network cross-linking density. Because gelatin has a sol-gel transition temperature around 30°C, it should be cross-linked chemically to avoid dissolution at body temperature [9]. Gelatin nanofibers play a dominant role in maintaining the biological and structural integrity of various tissues and organs, including bone, skin, tendon, blood vessels and cartilage. There are several commercially available gelatin based carriers for drug delivery that are being applied in tissue engineering [10]. Physical and chemical permeation enhancers can be used in conjunction with cellulose bacterial membrane (Nanoskin[®]) to affect the desired level of delivery. Early results also showed that hyaluronic acid (HA) was effective in protecting retinal damage during ophthalmic surgery, reducing scarring, preventing post-operative adhesions and reducing pain while increasing mobility in arthritic joints [11]. In addition, HA also provides important structural sup-

*Address correspondence to this author at the Department of Physical Chemistry- UNESP/Araraquara-SP, 14800-900, Brazil; Tel: (55)1149012998; E-mail: gmolyveira@yahoo.com.br

Nanofiber Scaffolds Support Bone Regeneration Associated with Pulp Stem Cells

Gerson Arisoly Xavier Acasigua^{1,2,*}, Lisiane Bernardi^{1,2}, Daikelly Iglesias Braghioroli^{2,3}, Manoel Sant'Ana Filho¹, Patricia Pranke^{2,3,4} and Anna Christina Medeiros Fossati^{1,5}

¹Dentistry Post-graduation Programme; Federal University of Rio Grande do Sul – Brazil; ²Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy; Federal University of Rio Grande do Sul – Brazil; ³Material Science Post-graduation Programme; Federal University of Rio Grande do Sul – Brazil; ⁴Stem Cell Research Institute; Porto Alegre, Rio Grande do Sul – Brazil; ⁵Department of Morphological Sciences; Federal University of Rio Grande do Sul – Brazil

Abstract: Currently, there are a number of alternatives for bone grafting, though when used correctly they present physical, chemical or biological limitations, which justifies the pursuit for new alternatives for bone regeneration. This study gives a report on the potential for bone regeneration in the use of biodegradable nanofibers from poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) in association with human mesenchymal stem cells from dental pulp of deciduous teeth (SCDT). Five samples of SCDT were seeded with scaffolds (test) or without scaffolds (control) for cell adhesion and viability assay. To evaluate the ability of the association in promoting bone formation, critical defects were made in the calvarium of rats (n=20), which were then divided into the following groups: I – sham group; II – implant of scaffolds; III – scaffolds/SCDT; and IV – scaffolds/SCDT. They were kept for 13 days in osteogenic media. After 60 days, the histomorphometric analysis was performed. It was observed that the adherence and viability of SCDT in the control and test group were similar throughout the experiment ($p>0.05$). The association of scaffolds/SCDT maintained in osteogenic media, showed greater bone formation than the other groups ($p<0.05$). The study demonstrated that the association of SCDT seeded in biodegradable PLGA scaffolds has the ability to promote bone regeneration in rats, which is a promising alternative for application in regenerative medicine.

Keywords: Bone regeneration, deciduous teeth, human mesenchymal stem cells, nanotechnology, scaffolds, tissue engineering.

1. INTRODUCTION

Bone loss represents a challenge to reconstructive surgery, as in many cases it is necessary to select a source for bone grafting for treatment. In the search for bone sources, bone banks can be accessed, for the use of tissue from patients with inherent morbidity [1-2]. Other sources of bone can be used from xenografts which are marketed as inert and free of antigens, but which have poor osseointegration [3]. Another possibility is to use hydroxyapatite biomaterials that are biocompatible, but they often have poor ossification in more internal grafts [4]. Lyophilized bone is another choice, which has osteoinductive capacity but which does not provide optimal biomechanical properties when used as structural implants [5]. The autologous donor sites are considered the gold standard in bone grafting; however, the availability of donor sites may become restricted in some patients and their systemic conditions may represent a limiting factor [6]. Thus, despite the availability of different methods for bone grafting, the existence of limiting factors (physical, chemical or biological) associated with such options justifies the pursuit for new alternatives for

bone regeneration [7]. Bioengineering, therefore, involves the use of biomaterials and cellular therapy, providing an adequate and viable solution for tissue regeneration [8]. Scaffolds are among the available biomaterials used in bioengineering, that can physically simulate an extracellular matrix (ECM), functioning as a framework for cell adhesion and proliferation when associated with cellular therapy [9-10]. Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is a polymer used for the fabrication of scaffolds which presents no toxicity, has biocompatibility and has a controllable rate of degradation because of the lactic acid and glycolic acid ratios [11, 12]. The biodegradation of PLGA involves the hydrolysis of ester linkages in their backbone chains, generating lactic acid and glycolic acid [13, 14]. These products of reaction are metabolized by the Krebs cycle and eliminated through urine and breath as CO_2 and H_2O . When produced by the electrospinning technique, the PLGA scaffolds are a highly porous structure, which is of great importance because it provides structural space to accommodate the cells and promotes an efficient exchange of nutrients and metabolic residues between the cell and the environment [9]. Aside from the use of biomaterials, another important branch of bioengineering is cellular therapy with the use of stem cells. Human beings possess different niches of adult stem cells, amongst which are included stem cells from dental pulp of deciduous teeth (SCDT) [15, 16]. These cells are obtained from an easily accessible

*Address correspondence to this author at the Faculty of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, St. Ramiro Barcelos, n. 2492 Room: 503, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil – Zip code: 91003-003; Tel: +55 51 3308-5024; Fax: +55 51 3308-5010; E-mail: gacasigua@yahoo.com.br

Mesenchymal Stem Cells and Nanofibers as Scaffolds for the Regeneration of Thyroid Cartilage

Geraldo P. Jotz, MD, PhD; Paula R. da Luz Soster, PhD; Seno O. Kunrath, MD, PhD;
Daniela Steffens, MSc; Daikelly I. Braghirolli, MSc; Claudio Galleano Zettler, MD, PhD;
Carlos A. Beck, PhD; Marcelo Muccillo, MSc; Rui F. F. Lopes, PhD;
Bernardo Mastella; Patricia Pranke, PhD

Objectives/Hypothesis: The aim of this study has been to establish an alternative approach in the form of regeneration of the thyroid cartilage.

Study Design: Four 1-month old pigs (*Sus scrofa*) were used (divided into 3 groups) and submitted to general anesthetic to perform cervicotomy with exposure of the thyroid cartilage in a total of 12 (twelve) samples.

Method: A resection of 4.0 cm² of cartilage was carried out in the right upper region and in the left upper and lower left region of the cartilage, where a scaffold with or without stem cells was implanted. In the left lower region, no biomaterial was implanted and the defect was left open (lesion control [L]).

Results: The average extension of the cartilaginous neoformation of L group was 136.3 μm (\pm 9.6) and 387.7 μm (\pm 43.2) in the scaffold (SCA) group, presenting a significant statistical difference ($P < 0.01$). The analysis carried out on the lesion site sections of the cartilage of the larynx of the animals from the SCA group + mesenchymal stem cells (SCA+MSC) showed an average of the extension of neocartilage of 825.4 μm (\pm 122.1), showing a more extensive area of neocartilage when compared to the other groups. These results demonstrated a high significantly statistical difference ($P < 0.001$) when compared with the L and SCA groups.

Conclusion: In 100% of the cases for which SCA+MSCs were used, a significant success in the cartilage growth and closing of the lesion in the thyroid cartilage was obtained compared to the other two groups for which MSCs were not used.

Key Words: Stem cells, thyroid cartilage, regeneration, scaffolds.

Level of Evidence: N/A.

Laryngoscope, 124:E455–E460, 2014

INTRODUCTION

Cancer of the larynx is diagnosed annually in approximately 10,000 men and women in the United States and is among the most common types of cancer of the upper aerodigestive tract.¹

Reconstruction of the airways, mainly those with cartilaginous formation in their structure, continue to challenge medical science. A very large variety of techniques for cartilaginous reconstruction have been

described in laryngotracheal reconstruction surgeries—not always with very promising results in milder cases (level II of Cotton) and those of benign origin.^{2,3}

These different therapeutic approaches have been developed around the world with the aim of offering an improvement in the life quality of this group of patients.

The main types of tracheobronchial substitutes that have been used in airway transplantation are synthetic prostheses, bioprostheses, allografts, autografts, and bio-engineered conduits. According to a recent review by Martinod et al.,⁴ despite the fact that research has been carried out in this area for more than 50 years, airway transplantation is still one of the biggest challenges for thoracic surgery and regenerative medicine.⁴

In the last decade, research using stem cells (SCs) has attracted a great deal of attention from the academic and scientific worlds because it shows enormous potential for modifying the concepts of traditional therapies, with a wide impact on genetic therapy, carcinogenesis, tissue damage, and regeneration, among others. The identification, isolation, and differentiation of embryonic stem cells have broadened the spectrum of potentials for cellular therapy. Recent findings⁵ have demonstrated the possibility of isolating skeletal muscular cells derived from SCs of embryoid bodies. The intramuscular and systemic transplantation of these cells in dystrophic

From the Department of Morphological Sciences (G.P.J., P.R.D.L.S., S.O.K., R.F.F.L.); the Hematology and Stem Cells Laboratory, Pharmacy School (D.S., D.I.B., P.P.); the Post Graduate Program in Physiology (D.S., D.I.B., P.P.); the Medicine Veterinary School (C.A.B., M.M.); the Medicine School; Federal University of Grande do Sul (B.M.); the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (C.G.Z.); and the Stem Cell Research Institute (R.R.), Porto Alegre, RS, Brazil.

Editor's Note: This Manuscript was accepted for publication June 3, 2014.

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and the Stem Cell Research Institute. The authors have no other funding, financial relationships, or conflicts of interest to disclose.

Send correspondence to Geraldo Pereira Jotz, MD, PhD, Department of Morphological Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Dom Pedro II 891/Room 604, Porto Alegre, RS, 90550-142, Brazil. E-mail: geraldo.jotz@terra.com.br

DOI: 10.1002/lary.24805

Laryngoscope 124: December 2014

Jotz et al.: The Regeneration of Thyroid Cartilage

E455

Evaluation of semi-automated cells counting in peritoneal fluid

Avaliação de semiautomação para contagem de células em líquido peritoneal

Euclides J. Braghirolli¹; Patricia Pranke^{2,3}; Luciane N. Gallo⁴

1. Laboratório de Hematologia e Citologia-Torres, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2. Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 3. Instituto de Pesquisa com Células-Torres, Porto Alegre; 4. Laboratório de Citologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ABSTRACT

Introduction: Currently, the cytological analysis of biological fluids, such as peritoneal fluid, is performed by manually cells counting in Fuchs-Rosenthal chamber. However, this method has a number of limitations. Because of these limitations, automatic counters have been evaluated for cell counting in this type of sample in order to make it faster and more reliable test. **Objective:** The aim of this study is to compare the manual and semi-automated leukocytes and erythrocytes counting in peritoneal fluid. **Materials and methods:** The samples were analyzed manually and using the Countess™ (Invitrogen). **Results:** The results showed that although there is a correlation between the two counting methods, the correlation is relatively low for both leukocytes and erythrocytes analysis. **Conclusion:** The results suggest that peritoneal fluid should continue to be analyzed in Fuchs-Rosenthal chamber. However, further studies should be conducted with a greater number of samples to investigate the possibility of using automated cells counting in serous fluids and, thus, provide greater speed and quality of results.

Key words: peritoneal fluid; ascites; cell count; body fluids.

INTRODUCTION

Ascites is a condition characterized by the accumulation of serous fluid between peritoneal membranes. The most frequent cause of this clinical condition is liver disease, such as cirrhosis, peritonitis and cancer^{1,2}. The study of serous fluid, also referred to as peritoneal ascites fluid, provides important information about differential diagnosis of stroke and disease status monitoring. Routine laboratory investigations of peritoneal fluid include physical, cytological, biochemical and bacteriological analyses³. This may also be complemented by other techniques, such as cytochemistry, immunocytology, cytogenetics and molecular biology. These analyses contribute to differentiate the fluid between exudate and transudate, evaluate the presence of tumor markers and detection of bacterial infections. They are, therefore, very important for clinical and therapeutic decisions-making^{4,5}.

Cytological analysis is the microscopic examination of the fluid, where total count and differential cell is performed⁶. Currently, most clinical laboratories perform cell count in serous fluid and cerebrospinal fluid (CSF) by manual microscopy using counting chambers, such as Fuchs-Rosenthal^{8,9}. However, this method has several limitations. Besides being a time-consuming technique, low accurate and has considerable inter and intra-operator variability, requiring highly skilled and experienced technicians⁹⁻¹⁰. Based on these facts, different automated devices have been evaluated for cell counts in different biological fluids^{9, 11, 12}. It is believed that the use of automation in this examination would help in obtaining more reliable results, better organization and manipulation of the samples, and optimization of time, human resources, space and material¹⁰. The semi-automated Countess™ (Invitrogen) is used for cell count, mainly in research laboratories. The present study has aimed to evaluate the semi-automated method for cells counting

First submission on 26/03/15; last submission on 05/04/15; accepted for publication on 22/06/15; published on 26/08/15

Effect of feeder free poly(lactide-co-glycolide) scaffolds on morphology, proliferation and pluripotency of mouse embryonic stem cells

No benefit of any kind will be received either directly or indirectly by the author(s).

Andrea G Galuppo^{1,2,3}, Pedro C Chagastelles^{1,2,3}, Douglas Gamba⁵, Daikelly B Iglesias^{1,4}, Laura Sperling^{1,2}, Janine Machado¹, Joachim Wendorff⁷, Cesar L Petzhold⁵, Patricia Pranke^{1,2,4,6}

¹Hematology and Stem Cell Laboratory, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS, Brazil; ² Stem Cell Laboratory, Fundamental Health Science Institute, Federal University of Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS, Brazil; ³ Post Graduate Program in Material Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁴ Post Graduate Program in Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul; Porto Alegre, RS, Brazil; ⁵ Laboratory of Organic Synthesis and Polymers, Institute of Chemistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁶ Stem Cell Research Institute; Porto Alegre, RS, Brazil; ⁷ Department of Chemistry Philipps University Marburg Germany

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as an 'Accepted Article', doi: 10.1002/jbm.a.35916

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Druckfreigabe/approval for printing	
Without corrections/ ohne Korrekturen	<input type="checkbox"/> Trim Size: 170mm x 244mm
After corrections/ nach Ausführung der Korrekturen	<input type="checkbox"/>
Date/Datum:	
Signature/Zeichen:	



7

Electrospun Scaffolds of Biodegradable Polyesters: Manufacturing and Biomedical Application

Patricia Pranke, Daniel E. Weibel, and Daikelly I. Braghirolli

7.1

Introduction

Polymeric materials have been applied successfully in many different fields, such as in membrane and thin-film technology, sensors, adhesion, protective coatings, microelectronic devices, composites, and other applications. Indeed, in the field of medical and related applications, polymers have been used extensively for decades and in particular in the last three decades a paradigm shift from bio-stable biomaterials to biodegradable (hydrolytically and enzymatically degradable) biomaterials has been observed [1]. It is expected that in the near future many of the permanent prosthetic devices used nowadays for temporary therapeutic applications will be replaced by biodegradable devices. These new medical tools could help the body to repair and regenerate damaged tissue in a natural way. The emergence of novel biomedical technologies, including tissue engineering, gene therapy, controlled drug delivery, and bionanotechnology are the main driving force for the aforementioned movement.

Current biomaterial research has contributed to major advances in regenerative medicine. In tissue engineering, cell therapy is complemented with biomaterials to be applied to damaged tissue and to assist in its repair. Biomaterials act as scaffolds, providing an initial supportive environment in which seeded cells can organize themselves and produce extracellular matrix (ECM) for subsequent regeneration of the damaged tissue [2]. An ideal scaffold should exhibit certain characteristics for successful application, such as (i) adequate architecture for cell attachment and proliferation, (ii) high number of interconnected pores for cell growth and transport of nutrients and metabolic waste, and (iii) mechanical properties suitable for its manipulation at the implantation site [3]. For these reasons, the selection of biomaterial types and their processing for the creation of the scaffolds are the most important factors for successful tissue reconstruction using tissue engineering principles.

Scaffolds can be produced from a variety of materials, including metals, ceramics, and polymers. In dental and bone implants, metallic alloys are preferred [4, 5], while ceramics with good osteoconductivity have been used for bone tissue